



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Denis Dantas da Silva**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS**

Natal/RN

2018

**DENIS DANTAS DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Parasitária da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte, como requisito à obtenção do título  
de Mestre em Biologia Parasitária

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes**

Natal/RN

2018

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN  
Sistema de Bibliotecas - SISBI  
Catalogação de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial Prof. Leopoldo Nelson - Centro de Biociências  
- CB

Silva, Denis Dantas da.

Avaliação de marcadores moleculares em pacientes portadores da doença de Chagas / Denis Dantas da Silva. - Natal, 2018.  
67 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes.

1. Doença de Chagas - Dissertação. 2. Trypanosoma cruzi - Dissertação. 3. Formas clínicas - Dissertação. 4. M2-PK - Dissertação. 5. Autoanticorpos - Dissertação. 6. Diagnóstico - Dissertação. I. Guedes, Paulo Marcos da Matta. II. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. III. Título.

RN/UF/BSE-CB

CDU 616.937

**DENIS DANTAS DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES EM PACIENTES  
PORTADORES DA DOENÇA DE CHAGAS**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Parasitária da  
Universidade Federal do Rio Grande do  
Norte, como requisito à obtenção do título  
de Mestre em Biologia Parasitária

Natal, 27 de fevereiro de 2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFRN

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Renata Antonaci Gama  
Departamento de Microbiologia e Parasitologia – UFRN

---

Dr<sup>a</sup>. Manuela Sales Lima Nascimento  
Instituto Internacional de Neurociências Edmond e Lily Safra – IIN-ELS

## **AGRADECIMENTOS**

Ao concluirmos uma etapa tão importante em nossa vida, é necessário agradecer àqueles que estiveram ao nosso lado, pois, sem apoio, nada somos.

Primeiramente, agradeço a Deus por toda energia e fé, que foram combustíveis essenciais na minha vida pessoal e acadêmica;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes, pelos ensinamentos desde a graduação e por me aceitar no laboratório, amizade, entusiasmo, inteligência magnífica e única; acima de tudo pela confiança que sempre me passou, em suas palavras e atos, sou muito agradecido;

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antônio Cláudia Jácome da Câmara, pelos grandes saberes compartilhados que tem na área, postura profissional e pela oportunidade de acompanhar das atividades em seu laboratório;

Aos Professores, Dr. Egler Chiari, Dr<sup>a</sup>. Lúcia Maria da Cunha Galvão e o Dr. Cléber de Mesquita Andrade pelo enriquecido acervo bibliográfico e todo material disponível relacionado a esse grande e desafiador projeto;

Aos meus amigos do Laboratório de Imunoparasitologia, especialmente, a Nathalie Sena e Tamyres Queiroga, pelas brincadeiras, parceria, ensinamentos desde a utilização correta de uma pipeta até técnicas, ambas, têm minha imensa gratidão. Aos colegas pelo apoio Nayana Araújo, Israelly Sena, Larissa Henrique, Meire Cruz, Janete Cunha e Redson Paulo;

Aos meus amigos e colegas conquistados nas Ciências Biológicas e Biologia Parasitária, que ficarão para sempre marcadas, em especial, Kianne Lamarca, Hannaly Wana, Julliette Medeiros, Brenda Alves, Camila Moraes, Márjore Lorena, Raíza Nara, Jéssica Marina, Ana Lú, Rony Lucas e Tianna Fernandes pela confiança, brincadeiras e compartilhamento de saberes;

Aos professores, alguns deles colegas, que contribuíram com informações valiosíssimas na minha formação como cidadão e profissional;

Aos meus pais, M<sup>a</sup> Lenilda e Armando Medeiros, dedico mais uma conquista, apesar da simplicidade, ofereceu-me algo muito valioso e que dinheiro no mundo

não compra o grande carinho, educação, respeito, ser verdadeiro com os outros e por nunca ter me tirado da escola;

Aos meus familiares, entre eles meus avôs, avós que estão no plano espiritual, tios, tias, primos e amigos, especialmente, Lucélia e Francisca que me ajudaram de forma direta ou indiretamente na minha vida.

Aos colegas que contribuíram com algumas imagens desse trabalho Jaerdyson Medeiros e o ítalô Rafael Carvalho;

Ao laboratório do Prof. Dr. Hugo Alexandre de Oliveira Rocha em conceder a utilização do leitor de placas para realização dos experimentos.

À Universidade Federal do Rio Grande do Norte e o Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária, pela oportunidade de aperfeiçoamento e uma excelente formação durante minha trajetória acadêmica, a CAPES, pela concessão da bolsa e o CNPq, pelo apoio financeiro do projeto;

Aos pacientes e voluntários, que foram o alicerce de todos os projetos e trabalhos publicados;

Ao grupo de bolsistas da Capes no *Facebook* pelos compartilhamentos de informações divertidas, informativos e tretas;

Ao Lula e a Dilma, pelo tanto que investiram na educação superior do Brasil;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que eu conseguisse alcançar esta conquista.

**“O principal objetivo da educação é criar pessoas capazes de fazer coisas novas e não simplesmente repetir o que as outras gerações fizeram.”**

**Jean Piaget**

## RESUMO

As formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas são observadas em 2% a 15% dos pacientes, e os mecanismos imunopatológicos que induzem o desenvolvimento continuam indefinidos. Ademais, a determinação do acometimento do esôfago e cólon em pacientes chagásicos acontece por meio de exames invasivos e incômodos e que na maioria dos casos não são realizados. Com isso, o paciente pode evoluir para forma mais grave da patologia com pior prognóstico. O objetivo desse trabalho foi avaliar o envolvimento da produção de autoanticorpos anti M2-piruvato quinase (M2-PK) e a possível associação com o desenvolvimento e/ou diagnóstico da forma digestiva da doença de Chagas. A produção de IgG total e isotipos (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) foi quantificada utilizando antígeno de formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* e a proteína humana M2-PK por meio da técnica de ELISA. Os testes foram realizados com soro de pacientes portadores das formas indeterminada (n=30), cardíaca (n=30), digestiva (n=15) e cardiodigestiva (n=15) da doença de Chagas, e correlacionada ao grau de dilatação do esôfago e do cólon. Amostras de soro de indivíduos não infectados (n=30) foram utilizadas como controles negativos. Pacientes chagásicos portadores das formas clínicas indeterminada, cardíaca, digestiva e cardiodigestiva apresentaram maior produção de anticorpos IgG total anti-*T. cruzi* e autoanticorpos anti M2-PK, quando comparados aos indivíduos não infectados. De maneira interessante, pacientes com a forma digestiva da doença apresentaram maior produção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK comparado a pacientes com a forma indeterminada, cardíaca e ao grupo controle saudável. Ainda, foi observada correlação positiva entre o tamanho do esôfago e do cólon com a produção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK. Os resultados indicam que a detecção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK é um método promissor não invasivo no diagnóstico do acometimento do sistema digestivo na doença de Chagas e a presença ainda pode estar envolvida no desenvolvimento da forma digestiva da doença.

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, Formas clínicas, M2-PK, Autoanticorpos, Diagnóstico.



## ABSTRACT

Digestive and cardiodigestive forms of Chagas' disease are observed in 2% to 15% of the patients, and the immunopathological mechanisms that induce development remain undefined. In addition, the determination of the esophagus and colon involvement in chagasic patients occurs through invasive and uncomfortable examinations, which in most cases are not performed. With this, the patient evolves to a more severe form of the pathology with worse prognosis. The objective of this work was to evaluate the involvement of the production of anti M2-pyruvate kinase autoantibodies (M2-PK) and the possible association with the development and / or diagnosis of the digestive form of Chagas' disease. The production of total IgG and isotypes (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) was quantified using the epimastigote antigen of *Trypanosoma cruzi* and the human M2-PK protein by the ELISA technique. The tests were performed with serum of patients with undetermined (n = 30), cardiac (n = 30), digestive (n = 15) and cardiodigestive (n = 15) Chagas disease, and correlated with the degree of dilatation of esophagus and the colon. Serum samples from uninfected individuals (n = 30) were used as controls. Chagas' patients with indeterminate, cardiac, digestive and cardiodigestive clinical forms presented higher production of anti-*T. cruzi* total IgG antibodies and anti-M2-PK autoantibodies compared to uninfected individuals. Interestingly, patients with the digestive form of the disease had a higher production of anti-M2-PK IgG4 autoantibodies compared to patients with the indeterminate, cardiac and healthy control groups. Moreover, a positive correlation was observed between esophageal and colon size with the production of anti M2-PK IgG4 autoantibodies. The results indicate that the detection of anti M2-PK IgG4 autoantibodies is a promising noninvasive method for the diagnosis of digestive system involvement in Chagas' disease and the presence may still be involved in the development of the digestive tract of the disease.

**Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Clinical forms, M2-PK, Autoantibodies, Diagnosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Origem e expressão da M2-PK no intestino.....	24
<b>Figura 2</b> - Delineamento experimental.....	27
<b>Figura 3</b> - Cartografia do Estado do Rio Grande do Norte. O mapa destaca com base na legenda os municípios dos pacientes chagásicos crônicos e controles da mesorregião do RN. Imagem fornecida pelo autor Ítalo Rafael Machado de Carvalho.....	30
<b>Figura 4</b> - Concentração de IgG total anti-epimastigota e M2-PK do soro dos indivíduos controles negativos ( CONT, n=30) e pacientes chagásicos com a forma indeterminada (IND, n=30), cardíaca (CARD, n=30), digestiva ( DIG, n=15) e cardiodigestiva (CARDIG, n=15). Os resultados individuais para cada participante são apresentados como significativos $\pm$ SEM. Em cada grupo está relacionado à média da absorbância medida pelo leitor de placas em absorbância de 450nm. As diferenças estatísticas de cada grupo são mostradas através de $P \leq 0,05$ (Dunner).....	35
<b>Figura 5</b> - Concentração dos isotipos de IgG específicos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-epimastigota e M2-PK do soro dos indivíduos controles negativos (CONT, n=30) e pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada (IND, n=30), cardíaca (CARD, n=30), digestiva (DIG, n=15) e cardiodigestiva (CARDIG, n=15) ). Os resultados individuais para cada participante são apresentados como significativos $\pm$ SEM. Em cada grupo está relacionado à média da absorbância medida pelo leitor de placas em absorbância de 450nm. As diferenças estatísticas de cada grupo são mostradas através de $P \leq 0,05$ (Dunner).....	37
<b>Figura 6</b> - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Dimensão do sigmoide (cm) de (a) e (b) A linha representa a regressão linear da comparação. O teste de correlação de classificação de <i>Spearman</i> considerou-se significativo quando o valor de P era $***P \leq 0,05$ .....	38

**Figura 7** - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Dimensão do reto (cm) de (a) e (b) A linha representa a regressão linear da comparação. O teste de correlação de classificação de *Spearman* considerou-se significativo quando o valor de P era  $P \leq 0,05$ .....39

**Figura 8** - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Grau do esôfago de (a) e (b) A linha representa a regressão linear da comparação. O teste de correlação de classificação de *Spearman* considerou-se significativo quando o valor de P era  $P \leq 0,05$ .....39

**Figura 9** – Modelo esquemático proposto da participação de autoanticorpos anti M2 piruvato quinase em pacientes chagásicos crônicos. Pacientes portadores da forma digestiva da doença de Chagas apresentam maior produção de autoanticorpos anti IgG4 anti M2-PK quando comparado a pacientes cardíacos, indeterminados e indivíduos saudáveis.....46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Marcadores moleculares protéicos.....	22
<b>Tabela 2</b> - Perfil clínico-epidemiológico dos 90 pacientes chagásicos da mesorregião do Estado do Rio Grande do Norte.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	“ <i>Adenosine Triphosphate</i> ” trifosfato de adenosina
CARD	Forma cardíaca
CARDIG	Forma cardiodigestiva
CCC	Cardiomiopatia chagásica crônica
DIG	Forma digestiva
ELISA	“ <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ” Ensaio imunoenzimático
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
ICT	Índice cardiotorácico
IFN - $\gamma$	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina isotipo G
IgM	Imunoglobulina isotipo M
IL	Interleucina
IND	Forma indeterminada
kDa	KiloDalton
M2-PK	“ <i>M2-isoform of Pyruvate Kinase</i> ” Isoforma da M2-piruvato quinase
NK	“ <i>Natural killer</i> ” Matadora natural
PBS	“ <i>Phosphate Buffered Saline</i> ” Salina Tamponada com fosfato acrescida
PBS-T	Salina Tamponada com fosfato acrescida de 0,05% Tween - 20%
TCD4 <sup>+</sup>	Linfócito T <i>helper</i>
TCD8 <sup>+</sup>	Linfócito T citotóxico
TGF- $\beta$	Fator de transformação de crescimento beta
Th	“ <i>T helper</i> ” Linfócito T auxiliar
Th1	Linfócito T <i>helper</i> tipo 1
Th2	Linfócito T <i>helper</i> tipo 2
TLRs	“ <i>Toll-like receptors</i> ” receptores semelhantes ao Toll
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
TNF- $\alpha$	“ <i>Tumoral necrosis factor</i> ” Fator de necrose tumoral alfa
Treg	T regulatório (a) (s)
UERN	Universidade do Estado do Rio Grande do Norte
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
WHO	“ <i>World Health Organization</i> ” Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 História, epidemiologia e ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	14
1.2 Patogenia da doença de Chagas .....	15
1.3 Resposta imunológica frente à infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	16
1.4 Diagnóstico da doença de Chagas .....	20
1.5 Autoanticorpos e o papel da M2-PK nas doenças intestinais .....	20
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 Objetivo geral .....	26
2.1 Objetivos específicos .....	26
<b>3. GRUPO CONTROLE, PACIENTES E METODOLOGIA .....</b>	<b>27</b>
3.1 Delineamento experimental .....	27
3.2 População de estudo .....	28
3.3 Avaliação clínica e imagens.....	31
3.4 ELISA .....	33
3.5 Análise estatística .....	34
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>40</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 História, epidemiologia e ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*

A Tripanossomíase Americana ou doença de Chagas foi descrita em 1909, pelo pesquisador brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas, durante as pesquisas na cidade de Lassance em Minas Gerais. O pesquisador descobriu uma nova moléstia, descreveu o agente etiológico da doença, o protozoário *Trypanosoma cruzi*, e o reservatório doméstico, o gato. Além disso, os diversos aspectos da patogenia e sintomatologia da doença em humanos e a biologia no hospedeiro vertebrado e invertebrado também foram descritos por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909; CHAGAS, 1916; CHAGAS, 1922).

A doença de Chagas ainda é um dos grandes problemas de saúde pública na América Latina. Segundo a Organização Mundial de Saúde, estima-se que seis a sete milhões de pessoas estejam infectadas pelo *T. cruzi*, só nos países latino-americanos. O Brasil possui apenas menor número de infectados que a Argentina, chegando, aproximadamente, a 1,2 milhões, além dos 26 milhões de indivíduos que se encontram em risco de adquirir a infecção (WHO, 2015; WHO, 2018). O estudo realizado entre 2007 e 2009 na mesorregião oeste do Estado do Rio Grande do Norte (**Figura 4**), mostra que, a estimativa de sorologia positiva para infecção pelo *T. cruzi* foi de 6,5%, correspondendo a 14 mil indivíduos infectados (BRITO *et al.*, 2012).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, subdividido em duas fases, uma no hospedeiro vertebrado e outra no hospedeiro invertebrado. Os triatomíneos, hospedeiros invertebrados, são infectados durante o repasto sanguíneo de animais ou seres humanos infectados com parasitos circulantes no sangue (formas tripomastigotas sanguíneas). No trato digestivo dos insetos, os tripomastigotas evoluem para as formas epimastigotas e, em seguida, na forma tripomastigota metacíclica na porção terminal do intestino (CHAGAS, 1909; BRENER, 1973; KIRCHHOFF, 2011).

A infecção nos hospedeiros vertebrados ocorre quando entram em contato com as formas metacíclicas infecciosas do parasito que são eliminados nas fezes e urina dos triatomíneos logo após o repasto sanguíneo. O contato pode ocorrer através da mucosa ou pela porta de entrada resultante da picada do inseto. Uma vez no hospedeiro vertebrado, os tripomastigotas metacíclicos invadem várias células nucleadas, e se diferenciam em amastigotas que iniciam a replicação por divisão binária no citosol celular (TYLER e ENGMAN, 2001; KIRCHHOFF, 2011; RASSI *et al.*, 2012;).

A célula, agora repleta com as formas amastigotas do parasito, sofre ruptura da membrana celular, por consequência libera formas tripomastigotas sanguíneas. Os parasitos invadem tecidos adjacentes, e disseminam por meio dos vasos linfáticos e corrente sanguínea. Em locais distantes apresentam tropismo, principalmente, por células do sistema imunológico, como macrófagos e também por células musculares do tecido cardíaco, como miócitos. Além do mais, são regiões de vários ciclos de multiplicação intracelular do *T. cruzi* (CHAGAS, 1922; BRENER, 1973; KIRCHHOFF, 2011; RASSI *et al.*, 2012).

## **1.2 Patogenia da doença de Chagas**

A doença de Chagas apresenta curso clínico em duas fases, aguda e crônica. Após o período de incubação (em média sete a dez dias) inicia a fase aguda da doença com duração de dois a quatro meses. Contudo, na maioria dos casos é despercebida e com sintomatologia clínica inespecífica como febre, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia, também podendo apresentar o sinal de Romaña, caracterizado por um edema bipalpebral e unilateral nos indivíduos chagásicos (CHAGAS, 1916; BARRETT *et al.*, 2003).

Cerca de 5 a 10% dos pacientes são acometidos por morte súbita durante a fase aguda da doença de Chagas. Os pacientes que evoluem para a fase crônica podem apresentar ausência de sinais e sintomas, e/ou alterações eletrocardiográficas e ecocardiográficas, caracterizando a forma indeterminada da doença (MACEDO & PENA, 1998; MACÊDO, 1999; RASSI JR *et al.*, 2000, ALMEIDA *et al.*, 2002). Alguns indivíduos podem desenvolver formas clínicas sintomáticas, como a forma cardíaca, que afeta cerca de 20 - 40% dos indivíduos



com sorologia reativa. Além das formas clínicas digestiva e cardiodigestiva, caracterizadas por lesões no trato digestivo (esôfago e cólon) e visualizadas na radiografia simples ou contrastada (enema opaco ou clister opaco). Logo, apresenta concomitância de lesões cardíacas e digestivas, respectivamente, entre 10 a 25 anos após a infecção inicial, caracterizando na maioria das vezes condições debilitante para o paciente (CHAGAS & VILLELA, 1922; DIAS, 1989; BARRETT *et al.*, 2003; RASSI *et al.*, 2012; DIAS *et al.*, 2016).

Historicamente, Ulysses Paranhos, em 1913, fez a primeira sugestão da associação entre a Tripanossomíase e a lesão no esôfago caracterizado pela dificuldade de deglutir os alimentos. Posteriormente, Carlos Chagas, em 1916, observou disfagia em pacientes na fase aguda da doença, e associou ao "mal de engasgo", verificado nas comunidades das zonas rurais onde a Tripanossomíase Americana era mais pertinente. No entanto, na época, o pesquisador era desprovido de equipamentos tecnológicos que confirmasse a hipótese, além da carência em novas pesquisas que provassem a associação entre a doença e a forma clínica digestiva (PARANHOS, 1913; CHAGAS, 1916; REZENDE & MOREIRA, 2004).

Estudos recentes de casos de megacólon e megaesôfago apresentaram compatibilidade com lesões no sistema nervoso autônomo intramural, devido a presença do parasito no tecido e ação do sistema imunológico, levando ao aparecimento dos "megas", ou seja, megaesôfago e megacólon (ANDRADE *et al.*, 2000; REZENDE & MOREIRA, 2000).

Na região Nordeste, os primeiros estudos de campo observaram casos de desconforto intestinal causado pela doença, que foi baseado na sintomatologia e sinais clínicos (MACÊDO, 1976). Diante disso, os estudos epidemiológicos recentes da mesorregião oeste potiguar mostram a prevalência de 51,6% para a forma indeterminada, 32,2% forma cardíaca e 8,1% para as formas clínicas digestivas e cardiodigestiva ou mista da doença (ANDRADE *et al.*, 2015).

### **1.3 Resposta imunológica frente à infecção pelo *Trypanosoma cruzi***

Durante o reconhecimento inicial pelo sistema imunológico, receptores da imunidade inata, como os receptores do tipo Toll (TLRs), reconhecem o parasito e induzem a fagocitose por macrófagos no tecido (células de *Langerhans*) ou monócitos no sangue periférico, células dendríticas, entre outros tipos de células

(GAZZINELLI & DENKERS, 2006). Neste processo, desencadeia a transcrição de genes em diversas citocinas inflamatórias, tais como, a interleucina-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que, por sua vez, estimula a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) pelas células *natural killer* (NK) e linfócitos T *helper* 1 (Th1) nos órgãos linfóides secundários. Com isso, estabelecendo a ligação da resposta imune inata e adaptativa. O IFN- $\gamma$ , juntamente com o TNF- $\alpha$ , potencializa a ação tripanosomicida dos macrófagos por catalisar a síntese de óxido nítrico e intermediários reativos de oxigênio, limitando a replicação do parasito até que ocorra o estabelecimento da resposta imunológica adaptativa (SILVA *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1995; ALIBERTI *et al.*, 1996; ABRAHAMSOHN *et al.*, 1996; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 2014).

Antígenos protéicos são reconhecidos por linfócitos B e T específicos nos órgãos linfóides secundários para iniciar as respostas imunes humorais. Neste ambiente, uma população de células T auxiliares foliculares, ativa as células B ao migrarem para o centro germinativo (GONZALEZ *et al.*, 2011; CERUTTI *et al.*, 2013). Os linfócitos B humanos diferenciam em plasmócitos podendo haver produção de imunoglobulinas das classes IgA, IgD, IgE, IgM e IgG. As cinco classes são definidas por diferenças nas sequências de aminoácidos dos domínios constantes da cadeia pesada (SCHROEDER JR E CAVACINI, 2010).

A IgA é o anticorpo predominante nas mucosas, incluindo saliva e leite materno (CORTHESEY, 2007). A imunoglobulina IgD circulante é encontrada em níveis muito baixos no soro com uma semi-vida sérica curta, além do mais, é expressa nas membranas das células B quando deixam a medula óssea e povoam os órgãos linfóides secundários (GEISBERGER, *et al.*, 2006). Já a IgE está associada a hipersensibilidade e a reações alérgicas bem como a resposta a infecções por helmintos (CHANG, *et al.*, 2007). A IgM é a primeira imunoglobulina expressa no soro, associados as respostas imunológicas primárias, atua também por opsonização (revestimento) sob o antígeno para destruição e fixação do sistema complemento (BOES, 2000).

A imunoglobulina IgG é o isotipo predominante encontrado no corpo, tem a meia-vida sérica mais longa de todos os isotipos de imunoglobulina. Com base em diferenças estruturais, antigênicas e funcionais apresentam quatro subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 em referência à ordem de classificação (IgG1>IgG2>IgG3>IgG4) dos níveis séricos desses anticorpos no soro de indivíduos normais e saudáveis.

Além disso, atua na neutralização de toxinas e vírus, na ativação da cascata do complemento que é um meio importante na opsonização do patógeno (NORMANSELL, 1987; SCHROEDER JR e CAVACINI., 2010; PLOMP, *et al.*, 2017 ;VALENZUELA E SCHAUB., 2018).

Subclasses IgG1 e IgG3 têm como principal função fixação pelo sistema complemento, as deficiências de IgG1, às vezes em combinação com outras deficiências de subclasse de IgG, estão associadas a infecções recorrentes (JEFFERIS E KUMARARATNE, 1990). Outrossim, os anticorpos, principalmente, os isotipos IgG1 e IgG3, persistem elevados ao longo da fase crônica do paciente (SCHROEDER JR E CAVACINI, 2010; RASSI *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014). A susceptibilidade aumentada a certas infecções bacterianas está associada com deficiência de IgG2, baixas concentrações de IgG2 geralmente ocorrem em associação com uma deficiência em IgG4 e / ou IgA1 e IgA2 (KUIJPERS, *et al.*, 1992).

IgG4 não fixa complemento e é reconhecida pelos mastócitos e basófilos (SCHROEDER JR E CAVACINI, 2010). Os anticorpos IgG4 são frequentemente formados após exposição repetida ou prolongada ao antígeno em um ambiente não infeccioso e pode se tornar a subclasse dominante (AALBERSE, *et al.*, 1983). A mudança para IgG4 pode ser modulada por IL-10 (citocina anti-inflamatória produzida por várias células, como CD8<sup>+</sup> ativadas, linfócitos, mastócitos e monócitos, além de atuar na inibição da síntese de citocinas, como o IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-12, TNF- $\beta$ ), ligando esta subclasse a regulação de respostas imunes ou indução de tolerância (AALBERSE, *et al.*, 2009). Além disso, as infecções por helmintos podem resultar na formação de anticorpos IgG4 (ADJOBIMEY E HOERAUF, 2010).

Durante a resposta imunológica frente à infecção pelo *T. cruzi*, plasmócitos produzem anticorpos IgM que permanecem durante a fase aguda da doença e depois decaem. Em seguida, o aumento da produção de anticorpos IgG atua na opsonização do parasito, ativação do sistema complemento, citotoxicidade mediada por célula e dependente de anticorpo entre outras funções na resposta imune humoral (SCHROEDER JR e CAVACINI., 2010; RASSI *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2014).

Os linfócitos TCD8<sup>+</sup> apresentam importante papel protetor, principalmente durante a fase aguda da infecção. As células TCD8<sup>+</sup> armazenam em grânulos citoplasmáticos, granzima e perfurina que induz a morte celular programada

(apoptose) de célula infectada com parasitos. Camundongos deficientes de linfócitos TCD8 ou cuja população de TCD8<sup>+</sup> havia sido depletada, apresentam maior susceptibilidade à infecção por *T. cruzi* (TARLETON, 1990; TARLETON *et al.*, 1992; ROTTENBERG *et al.*, 1993; TARLETON *et al.*, 1994; TARLETON, 1995; ROTTENBERG *et al.*, 1995).

A ação das células TCD4<sup>+</sup>, a depender do perfil, está relacionada à resistência ao parasito, também na indução de macrófagos superativados por meio de citocinas inflamatórias, e contribuindo com a ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e linfócitos B (BRENER *et al.*, 1997). Além do mais, o baixo número de células TCD4<sup>+</sup> nas lesões cardíacas (HIGUCHI *et al.*, 1993a; HIGUCHI *et al.*, 1993b) e a diminuição de células no sangue periférico de pacientes com formas avançadas de megaeosôfago sugerem que algum tipo de imunossupressão influencia o prognóstico clínico da infecção chagásica (REIS *et al.*, 1996).

Os fatores imunopatogênicos envolvidos na doença de Chagas são vários, um exemplo clássico é o papel da resposta autoimune durante a infecção pelo o *T. cruzi* na forma cardiomiopática da doença (BONNEY E ENGMAN, 2014). A hipótese da autoimunidade sugere que o dano cardíaco, independentemente da causa inicial, leva a quebra de autotolerância, resultando em reação imunológicas contra autoproteínas (HYLAND, *et al.*, 2007) Embora a hipótese de autoimunidade tenha sido questionada por muitos autores devido à persistência do antígeno do parasito na fase crônica da doença, o que não necessariamente exclui a possibilidade de reações autoimunes (CUNHA-NETO *et al.*, 1995; KIEFSZENBAUM, 2005).

Alguns relatos descreveram autoanticorpos e células T auto-reativas, muitas vezes reativas com antígenos de *T. cruzi*, tanto em pacientes como em modelos animais. Ademais, respostas auto-imunes e antígeno de *T. cruzi* não são incompatíveis ou mutuamente exclusivas, e é provável que uma combinação de ambos esteja envolvida na patogênese da cardiomiopatia crônica da doença de Chagas. (CUNHA-NETO, *et al.*, 2011). No entanto, poucos sabem sobre os mecanismos de danos nos tecidos envolvidos no trato gastrintestinal (OLIVEIRA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2013).

Os pacientes que apresentam anormalidades no sistema nervoso entérico apresentam sistemáticos danos do plexo do nervo periférico, com acentuada reação inflamatória e consequente redução no número de células neurais (DE FARIA *et al.*, 1988; ZUCOLOTO & REZENDE, 1990). Por conseguinte, um estudo recente

demonstrou, em modelo murino, o aumento do comprimento e da espessura da parede do cólon. Além disso, fibrose, perda de neurônios no plexo mientérico e alterações na inervação intramuscular da musculatura lisa por intenso infiltrado inflamatório na fase crônica da doença simulando o que aconteceria em pacientes (CAMPOS *et al.*, 2016).

#### 1.4 Diagnóstico da doença de Chagas

O diagnóstico clínico da doença de Chagas deve ser confirmado pela utilização de dois testes sorológicos com princípios diferentes (CAMARGO E TAKEDA, 1979). O diagnóstico clínico da fase aguda é realizado no paciente sintomático com os sinais de porta de entrada da doença (sinal de Romaña e/ou Chagoma de inoculação) seguidos de sinais e sintomas inespecíficos (RASSI, *et al.*, 2000). Na fase crônica da doença são avaliadas as alterações cardíacas e confirmadas pelo eletrocardiograma e/ou ecocardiograma e as alterações digestivas reveladas pelos raios X (enema opaco) fazem suspeitar da fase crônica da doença (DIAS, *et al.*, 2016).

O diagnóstico laboratorial na fase aguda e crônica da doença de Chagas é realizado por exames parasitológicos e/ou sorológicos (CHIARI E BRENER, 1966). Dentre os exames da fase aguda, a literatura destaca o exame de sangue a fresco (PIFANO, 1954), esfregaço de sangue em gota pelo Giemsa, xenodiagnóstico (CERISOLA, *et al.*, 1974), hemocultura (CHIARI, *et al.*, 1989), reação de imunofluorescência indireta (RIFI), ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) (VOLLER, *et al.*, 1976) entre outros.

Na fase crônica, na rotina clínica são solicitados os exames sorológicos, com base principalmente na presença de anticorpos anti-*T. cruzi* no soro, como RIFI, Reação de hemaglutinação indireta, ELISA entre outros (CAMARGO E TAKEDA, 1979). Além disso, como critério de cura é preconizado pelo Ministério da Saúde pelo menos dois métodos com princípios diferentes (DIAS, *et al.*, 2016). No entanto, a literatura destaca biomarcadores sendo fortes candidatos para diagnóstico das formas clínicas de pacientes chagásicos (BASQUIERA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005; SARAVIA *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; KEATING *et al.*, 2015).

### 1.5 Autoanticorpos e o papel da proteína M2-PK nas doenças intestinais

Até o presente momento foram identificados diversos marcadores associados à forma cardíaca da doença de Chagas, como a Troponina T (BASQUIERA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005; SARAVIA *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; KEATING *et al.*, 2015), Miosina e vários marcadores solúveis, por exemplo, IFN- $\gamma$ , IL-6, Creatina Quinase entre outros (KEATING *et al.*, 2015). Entretanto, o mecanismo de desenvolvimento das lesões do trato digestivo e a identificação de marcadores para o desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas a literatura dispõe de poucas publicações. Por exemplo, a relação do aumento dos níveis de anticorpos IgA contra os antígenos recombinantes de citoplasma (CRA) e flagelo (FRA) do parasito, apenas descriminando as formas digestiva e mista de indeterminada e cardíaca da doença de Chagas (VASCONCELOS *et al.*, 2010).

Indivíduos com a forma digestiva da doença de Chagas apresentam níveis mais elevados de imunoglobulina IgG4 e interleucina 10 (PISSETTI *et al.*, 2009). Diante disso, os marcadores de doenças do trato digestório humano, atualmente descrito, tornam promissoras para avaliação em pacientes chagásicos, como a calprotectina fecal (YEH & LIAO, 2004; SCHOEPPER *et al.*, 2010; RODRÍQUEZ-MORANTA *et al.*, 2013; SIDDIQUI *et al.*, 2017), a lactoferrina (BEVEYE *et al.*, 1999; KANE *et al.*, 2003; DESAI *et al.*, 2007; SIDDIQUI *et al.*, 2017) e a M2-piruvato quinase (HENTZE, 1994; MAZUREK *et al.*, 1996, 2001a, b, 2007, 2011; ENGEL *et al.*, 2004; DONG *et al.*, 2016 ) (**Tabela 1**).

Todas estão relacionadas principalmente às doenças inflamatórias intestinais, como a doença de *Crohn* e colite ulcerativa, ambas, doenças inflamatórias intestinais crônicas e câncer colorretal (DONG *et al.*, 2016). Outras avaliações são utilizadas na rotina laboratorial, como a proteína C reativa e a velocidade de hemossedimentação ou taxa de sedimentação de eritrócitos. As avaliações são utilizadas no acompanhamento e monitorização das doenças inflamatórias, embora esses marcadores não sejam específicos como instrumentos avaliativos da inflamação intestinal (VAN *et al.*, 2010; DIGNASS *et al.*, 2012).

**Tabela 1** – Marcadores moleculares protéicos.

Marcadores protéicos de doenças inflamatórias intestinais (DII)	Marcadores protéicos cardíacos na doença de Chagas	Marcadores protéicos digestivos na doença de Chagas
<b>CALPROTECTINA FECAL</b> YEY & LIAO, 2004; SCHOEPPER <i>et al.</i> , 2010; RODRÍQUEZ-MORANTA <i>et al.</i> , 2013; SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2017	<b>TROPONINA T</b> BASQUIERA <i>et al.</i> , 2003; MACHADO <i>et al.</i> 2005; SARAIVA <i>et al.</i> , 2011; NUNES <i>et al.</i> , 2013; KEATING <i>et al.</i> , 2015.	<b>NÍVEIS MAIS ELEVADOS DE IgG4 E IL- 10</b> PISSETTI <i>et al.</i> , 2009.
<b>LACTOFERRINA</b> BEVEYE <i>et al.</i> , 1999; KANE <i>et al.</i> , 2003; DESAI <i>et al.</i> , 2007; SIDDIQUI <i>et al.</i> , 2017	<b>MIOGLOBINA, IFN-<math>\gamma</math>, IL-6, CREATINA QUINASE ENTRE OUTROS</b> KEATING <i>et al.</i> , 2015.	<b>AUMENTO DOS NÍVEIS DE ANTICORPOS IgA CONTRA CRA E FRA.</b> VASCONCELOS <i>et al.</i> , 2010.
<b>M2- PIRUVATO QUINASE</b> HENTZE, 1994; MAZUREK <i>et al.</i> , 1996, 2001a, b, 2007, 2011; ENGEL <i>et al.</i> , 2004; DONG <i>et al.</i> , 2016		

A proteína piruvato quinase (PK), da família das transferases, enzima chave na etapa final da via glicolítica, expressa por todas as células em isoformas diméricas ou tetraméricas (EIGENBRODT E GLOSSMANN, 1980; CHUNG-FAYE *et al.*, 2007). A isoforma dimérica (M2-PK) é uma isoenzima com 58kDa, com 531aminoácidos, organização espacial quaternária e participa de uma série de regulações metabólicas, inclusive associações com várias enzimas da própria via glicolítica e com oncoproteínas reguladoras (HENTZE, 1994; MAZUREK *et al.*, 1996, 2001a, b, 2007, 2011; ENGEL *et al.*, 2004).

A proteína está presente em tecidos proliferativos e indiferenciados, especialmente na divisão celular. Além do mais, alguns trabalhos mostram que a

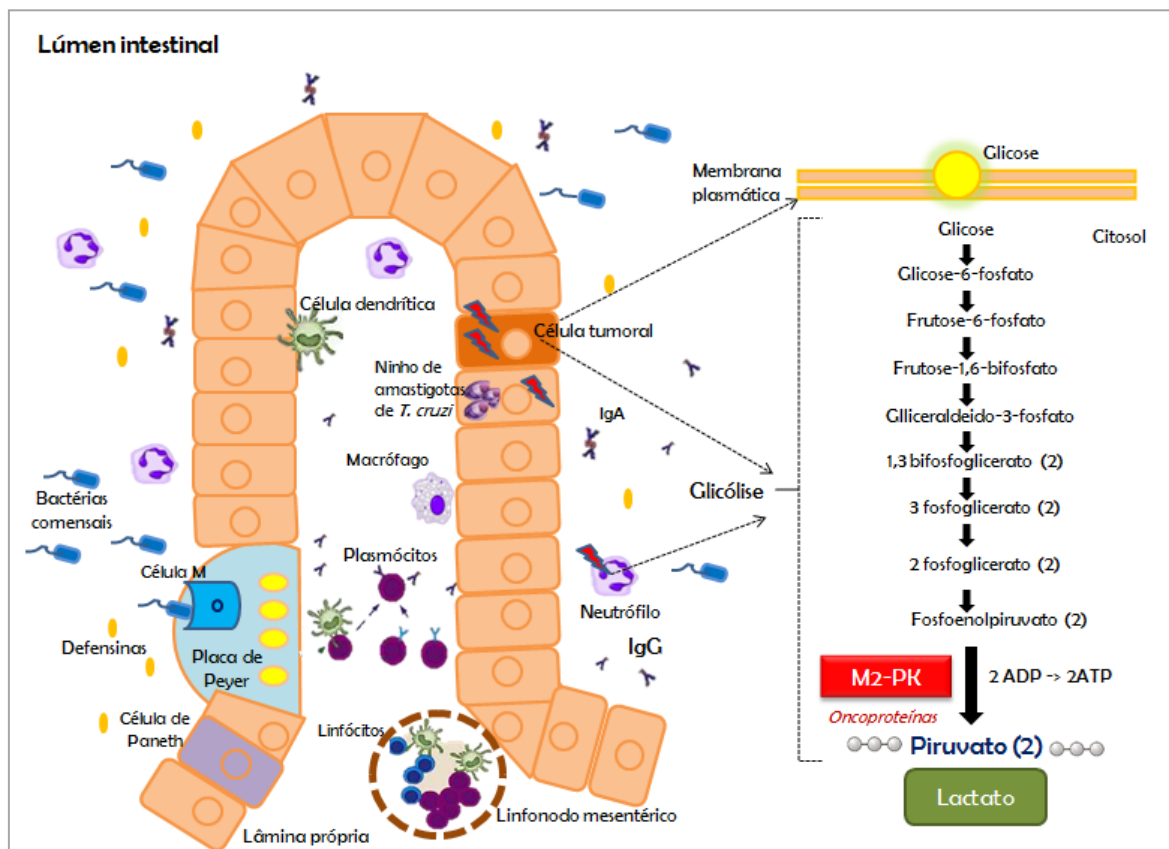
proteína está aumentada na degradação de leucócitos danificados e extravasamento do conteúdo intracelular no lúmen intestinal que se acumula durante o processo inflamatório. O processo inflamatório é aumentado, em situação patológica, pelos próprios microorganismos comensais e partículas alimentares que usam as fistulas e danos como porta de entrada para a lâmina própria. Ademais, naturalmente, na Placa de *Peyer* temos as células multifenestradas (célula M) que são expostas diretamente aos antígenos do lúmen intestinal e (EIGENBRODT & GLOSSMANN, 1980; HARDT *et al.*, 2000; EBERL & LOCHNER, 2009) que as células dendríticas usam essa porta de entrada para captura dos antígenos (**Figura 2**) (IWASAKI, 2007; RESCIGNO & SABATINO, 2009).

A M2-PK é liberada e detectada no plasma e nas fezes como uma molécula estável e resistente às endoproteases microbianas. Os níveis desta proteína são aumentados em pacientes com câncer colorretal devido ao metabolismo anaeróbico da glicose em células tumorais. Porque rende muito mais ATP do que a oxidação completa a dióxido de carbono que ocorre nas células saudáveis nas condições aeróbicas. Além disso, a proteína em condições anormais é regulada por oncoproteínas, que no decorrer do catabolismo da glicose e os vários produtos resultantes das fases preparatória (glicose-6-fosfato, frutose-6-fosfato, frutose, 1,6-bifosfato e gliceraldeído-3-fosfato) e compensatória gerando duas moléculas em cada quebra (gliceraldeído-3-fosfato, 1,3 bifosfoglicerato, 3 e 2 fosfoglicerato, fosfoenolpiruvato e piruvato). O produto da degradação da glicose será o piruvato sendo convertido, principalmente, a lactado (**Figura 2**) (HARDT *et al.*, 2004; CHUNG-FAYE *et al.*, 2007; CZUB *et al.*, 2007; SHASTRI *et al.*, 2008; MAZUREK, 2011; DONG *et al.*, 2016). Ademais, o soro contendo a M2-PK pode ser utilizado como um teste primário de triagem em rastreamento em massa de câncer colorretal, podendo ser um biomarcador promissor e não invasivo (MENG *et al.*, 2012).

Devido a grande quantidade dessa isoenzima que se forma, acaba por estimulando ao organismo a produzir autoanticorpos. Os autoanticorpos são produzidos pelo sistema imunológico e atuam contra proteínas do próprio organismo que o produziu, além, de serem registros da maioria das doenças autoimunes. Também são capazes de lesionar tecidos por indução da ativação do sistema complemento, ativação da citotoxicidade mediada por células da resposta imune e apoptose (GLEICHER *et al.*, 2007; FRITZLER, 2008; SHOENFELD *et al.*, 2008).



Autoanticorpos contra diferentes antígenos podem estar envolvidos na fisiopatologia da doença, levar ao agravamento de doença concomitante ou pré-existente ou atuar como marcador molecular (VILELA *et al.*, 2017). Com base nisso, os autoanticorpos atuam contra antígenos humanos, inclusive, a literatura relaciona esta produção com a cardiomiopatia, e a produção de autoanticorpos de proteínas cardíacas como a miosina e a troponina T (TIBBETTS *et al.*, 1994; BASQUIERA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005; SARAVIA *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; KEATING *et al.*, 2015).



**Figura 1** - Origem e expressão da M2-PK no intestino. Na lâmina própria, o ambiente favorece a proliferação e apresentação das células dendríticas aos linfócitos T e B. Os plasmócitos produzem anticorpos (IgG) que estão aumentados devido aos danos celulares causados pelo *T. cruzi*, células tumorais e processo inflamatório. Figura elaborada pelo autor com dados obtidos de: EBERL E LOCHNER *et al.*, 2009; MAZUREK, 2011; DONG *et al.*, 2016; PEREZ-LOPEZ *et al.*, 2016.

Os mecanismos imunopatológicos que induzem o desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas continuam desconhecidos. Além disso, a determinação do acometimento do esôfago e cólon em pacientes acontece por exames invasivos e incômodos e que na maioria dos casos não são realizados, permitindo que o paciente evolua para quadro mais grave da doença.

A identificação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos no desenvolvimento das lesões do trato digestivo e a identificação de marcadores moleculares para a forma digestiva da doença podem auxiliar a redução da morbimortalidade da doença.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

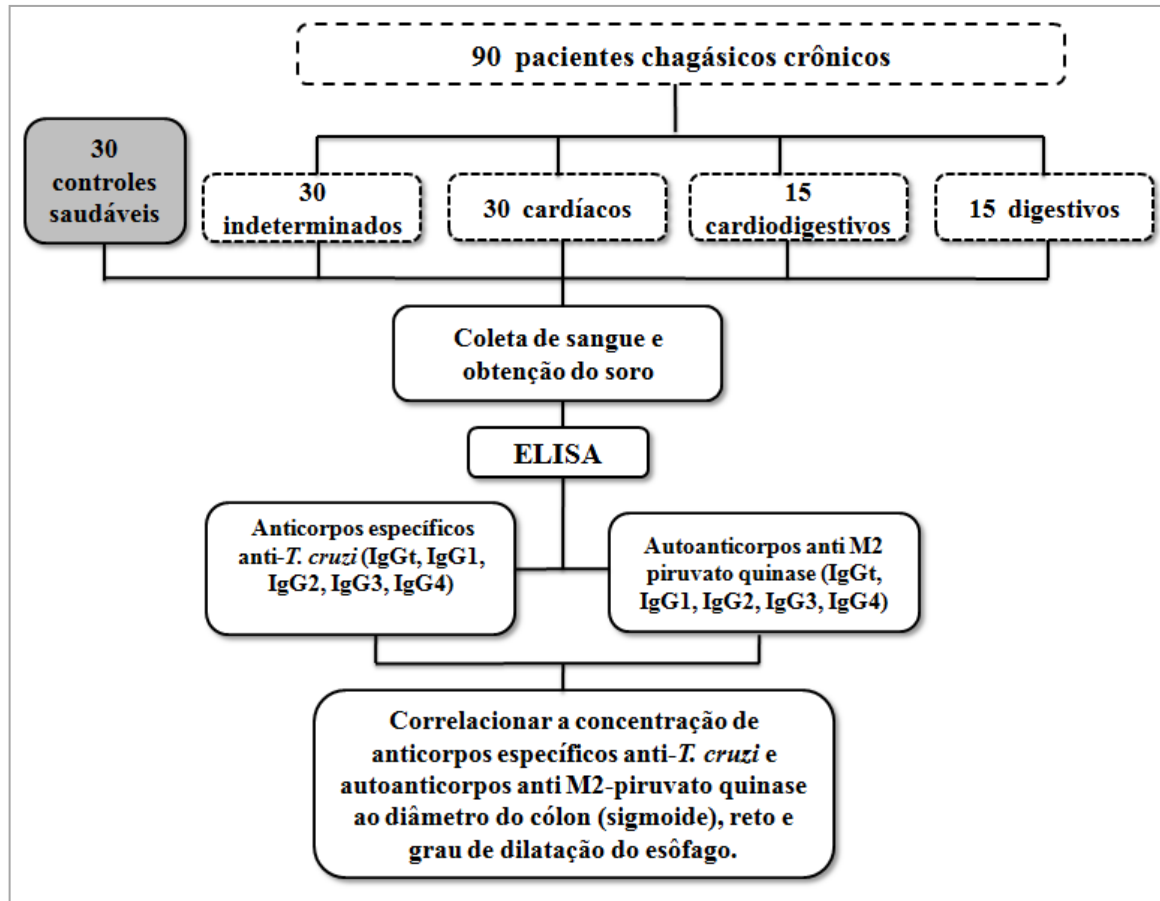
Avaliar a presença de autoanticorpos anti M2-piruvato quinase em pacientes portadores das diversas formas clínicas da doença de Chagas.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* (IgGt, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) no soro de pacientes chagásicos crônicos portadores das diferentes formas clínicas da doença;
- Investigar a produção de autoanticorpos (IgGt, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti M2-piruvato quinase no soro de pacientes chagásicos;
- Correlacionar à concentração de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e autoanticorpos anti M2-piruvato quinase ao diâmetro do cólon (sigmoide), reto e grau de dilatação do megaesôfago.

### 3. GRUPO CONTROLE, PACIENTES E METODOLOGIA

#### 3.1 Delineamento experimental



**Figura 2** - Delineamento experimental

### 3.2 População de estudo

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte sobre o protocolo Nº 027.2011 com o consentimento livre e esclarecido de todos os participantes (**Anexo A**). Todos os experimentos descritos foram realizados em conformidade com os princípios éticos contidos nas diretrizes do Conselho Nacional de Saúde e declaração de Helsinki sobre pesquisa envolvendo seres humanos (CEP/CONEP, 2015).

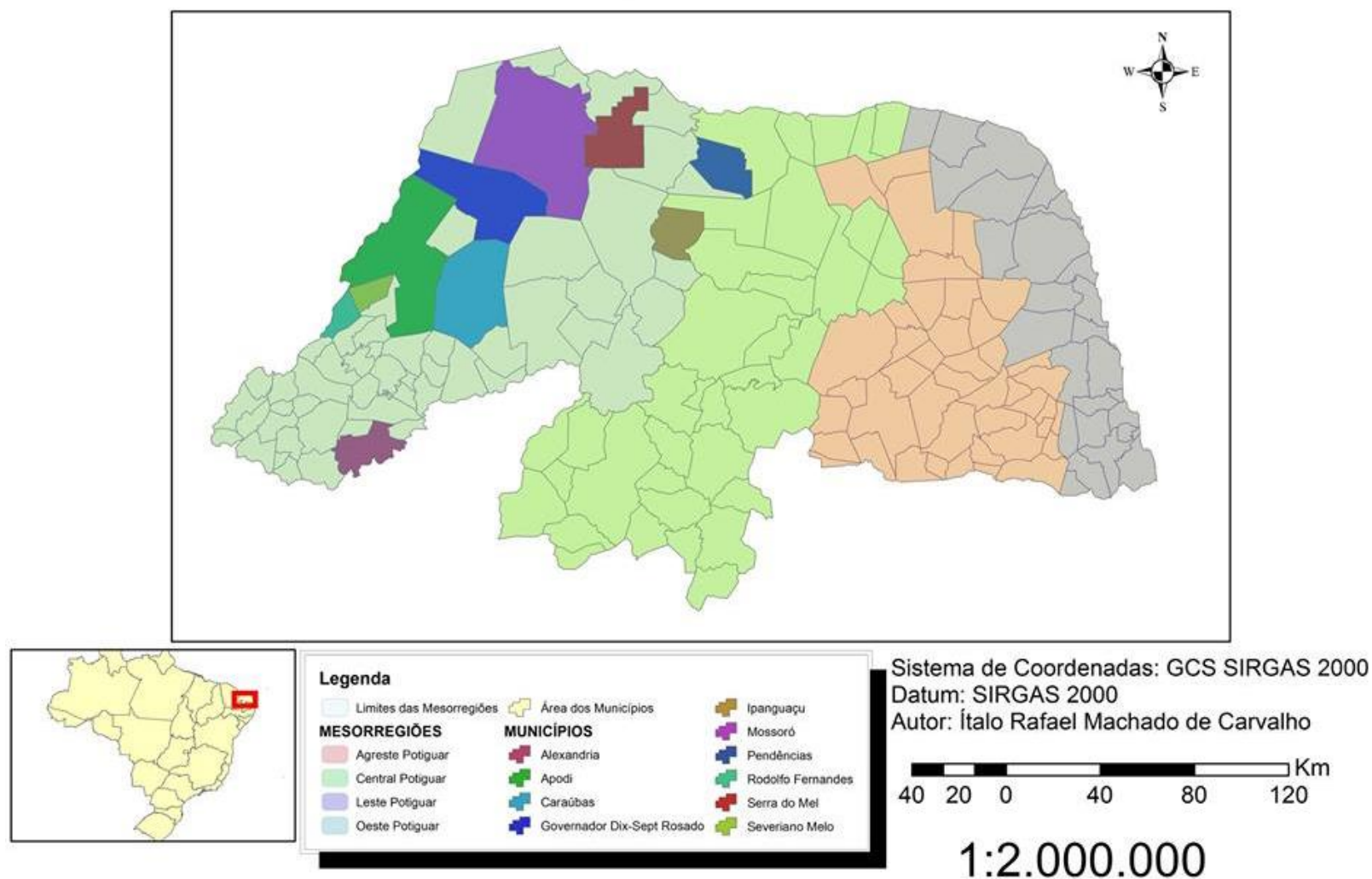
Um total de 90 pacientes chagásicos crônicos com as diferentes formas clínicas da doença e residentes de vários municípios da mesorregião do Estado do Rio Grande do Norte (Alexandria, Apodi, Caraúbas, Governador Dix-Sept Rosado, Ipanguacu, Mossoró, Pendências, Rodolfo Fernandes, Serra do Mel e Severiano Melo) foi selecionado para este estudo. Além disso, trinta indivíduos saudáveis da mesma área foram utilizados como controles negativos (**Figura 4**). O critério de inclusão adotado foi baseado na sorologia convencional reativa para a infecção por *T. cruzi*.

Todas as amostras obtidas foram submetidas à triagem sorológica por métodos com princípios distintos Chagastest® HAI *screening* A-V, ELISA recombinante (WienerLab®, Rosário, Argentina) e reação de imunofluorescência indireta usando como antígeno as formas epimastigotas do *T. cruzi* da cepa Y mantidas em cultivo e fixadas com formaldeído a 20%.

A imunoglobulina anti-IgG humana marcada com isotiocianato de fluoresceína (*Sigma ChemicalCompany*®, Missouri, USA) foi utilizada como conjugado, e o ponto de corte o título de 1:40, sendo considerada positiva a amostra com resultado reativo em pelo menos dois dos métodos selecionados, de acordo com as recomendações da Organização Mundial de Saúde e Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS, *et al.*, 2015).

Após o recrutamento, todos os indivíduos com resultado reativo na sorologia confirmatória por *Western blot* (TESAcrusi, bioMérieux Brasil) foram submetidos a uma avaliação clínica completa, incluindo eletrocardiograma (ECG) e radiografia do tórax, 2D-ecocardiograma, raio x contrastado de esôfago e colón e, para os casos

com alterações cardíacas foi realizada a avaliação pelo Holter durante 24h. Em seguida, os indivíduos selecionados foram classificados de acordo com a forma clínica, da seguinte maneira: os que não apresentarem alterações eletrocardiográficas e radiográficas sugestivas de envolvimento cardíaco ou gastrointestinal, forma indeterminada (IND, n=30); aqueles que apresentarem exclusivamente alterações cardíacas, forma cardíaca (CARD, n=30); e aqueles com alterações no esôfago e cólon “megas” forma digestiva (DIG, n=15) e, aqueles com megaesôfago ou megacólon associados cardiomiopatia, cardiodigestiva (CARDIG, n=15).



**Figura 3** - Cartografia do Estado do Rio Grande do Norte. O mapa destaca com base na legenda os municípios dos pacientes chagásicos crônicos e controles da mesorregião do RN. Imagem fornecida pelo autor Ítalo Rafael Machado de Carvalho.

### 3.3 Avaliação clínica e de imagens

A avaliação clínica foi conduzida em todos pacientes e os dados publicados pelo médico colaborador, Prof. Dr. Cléber Mesquita de Andrade (UERN) e colaboradores (ANDRADE *et al.*, 2015), que foram submetidos ao ecocardiograma abrangente com mapeamento de fluxo em cores (*VIVID e, GE Healthcare, USA*). As técnicas ecocardiográficas e cálculos das diferentes dimensões e volumes cardíacos foram avaliados de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Ecocardiografia (LANG, *et al.*, 2005).

A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE) foi calculada de acordo com a regra de Simpson modificada (método biplano). O Holter 24h foi empregado apenas em pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) usando um sistema de três canais de gravação portátil (Cardiolight®, Cardios, São Paulo, Brasil) e analisada num sistema DMI-CardiosHolter 8300, utilizando técnica semiautomática. Os pacientes foram incentivados a continuar suas atividades normais durante o período de gravação.

Os exames foram realizados e analisados por um observador experiente, que desconhece o perfil sorológico, as medições de anticorpos e dados clínicos dos participantes. Todas as coletas e exames foram realizados antes do tratamento específico com o fármaco benzonidazol e um ano após a terapêutica quando os pacientes foram novamente recrutados e os exames clínicos e imunológicos realizados. (**Tabela 2**)



**Tabela 2** - Perfil clínico-epidemiológico dos 90 pacientes chagásicos da mesorregião do Estado do Rio Grande do Norte.

Variáveis	Forma clínica de pacientes chagásicos							
	Indeterminada		Cardíaca		Digestiva		Cardiodigestiva	
M	11		17		5		10	
Gênero								
F	19		13		10		5	
Total	30		30		15		15	
	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP	MÉDIA	DP
Média das idades	44,1•	10,11	49	12,25	57,6•	8,9	65•	10,6
ICT	0,449	0,04	0,478	0,037	0,429	0,035	0,496	0,048
FEVE (%)	64,666	6,899	63,3	13,057	67	7,848	53,846	13,637
Dim do sig (cm)	4,405	0,625	4,338	0,803	7,672	4,014	8,315	2,374
Grau do sigmoide	-		-		0,818	0,981	0,846	0,800
Dim do reto (cm)	5,666	1,092	5,52	1,081	7,3	2,892	6,7	1,636
Grau do megaesôfago	-		-		0,454	0,820	0,846	1,344

M: masculino; F: feminino; DP: desvio padrão; ICT: índice cardiorácico; FEVE: fração de ejeção do ventrículo esquerdo em %; Dim do sig: Diâmetro do sigmoide; Dim do reto: Diâmetro do reto; Valores de normalidade: ICT  $\leq$  0,5; FEVE  $>$  55%; Grau do megaesôfago: graus de I a IV; Grau sigmoide: graus de 1 a 3. \*Dados fornecidos pelo medico colaborador deste trabalho.

### 3.4 ELISA

#### Análise do perfil de imunoglobulinas pelo método de ELISA

O método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) foi utilizado para a dosagem de IgG total e subclasses IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 (VOLLER *et al.*, 1976). A proteína recombinante M2-piruvato quinase (*Sigma-AldrichCo, USA*, SAE0021-1MG) e as formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em meio acelar (*Liver Tryptoseinfusion – LIT*) foram utilizados como antígenos e dosados pelo método descrito (LOWRY *et al.*, 1951). Posteriormente foi realizada a titulação em bloco visando definir a concentração mínima de antígeno para a sensibilização das placas plásticas de fundo chato com 96 poços (*Corning/Costar*, 3590). As concentrações utilizadas foram 7,5 µg/mL (antígeno de epimastigota) e 0,5 µg/mL (antígeno de M2-piruvato quinase). Os conjugados utilizados para a dosagem de IgG total e suas subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) foi anti-imunoglobulina humana obtida de soro imune de camundongo marcadas com peroxidase (*Sigma Chemical Company, St. Louis, USA*). As placas de ELISA foram sensibilizadas com 100µL do antígeno diluído em solução tampão carbonato/bicarbonato (15mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 34mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9.6) e incubadas de 18 a 24h a 4°C durante a noite. Após a incubação, as placas sensibilizadas foram submetidas a uma série de quatro lavagens com PBS (salina tamponada com fosfato) contendo 0,05% de *Tween*20 para remover o excesso de solução antigênica, e eventuais sítios de ligação bloqueados com PBS contendo 1% de SBF (soro bovino fetal) por 45min a 37°C. Após novas lavagens, adicionou-se à placa soro humano diluído em PBS-T (salina tamponada com fosfato acrescida de 0,05% *Tween*-20) e, então as placas serão novamente incubadas por 45min a 37°C. Em seguida, as lavagens foram repetidas e as placas dos isotipos de Ig posteriormente incubadas com 100µL de conjugado de peroxidase com anticorpo específico diluído em PBS-T a temperatura ambiente por 45min. As últimas lavagens foram seguidas pela solução de 100µL do substrato 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina e 20µL peróxido de hidrogênio (ambos, LGC Biotecnologia) por 20min em temperatura ambiente e local protegido da luz. A reação foi interrompida pela adição de 32µL por poço de uma solução de ácido sulfúrico 2,5M e a leitura das placas realizada em espectrofotômetro com filtro de 450nm (Leitora de Microplacas *Mindray®*, model MR-

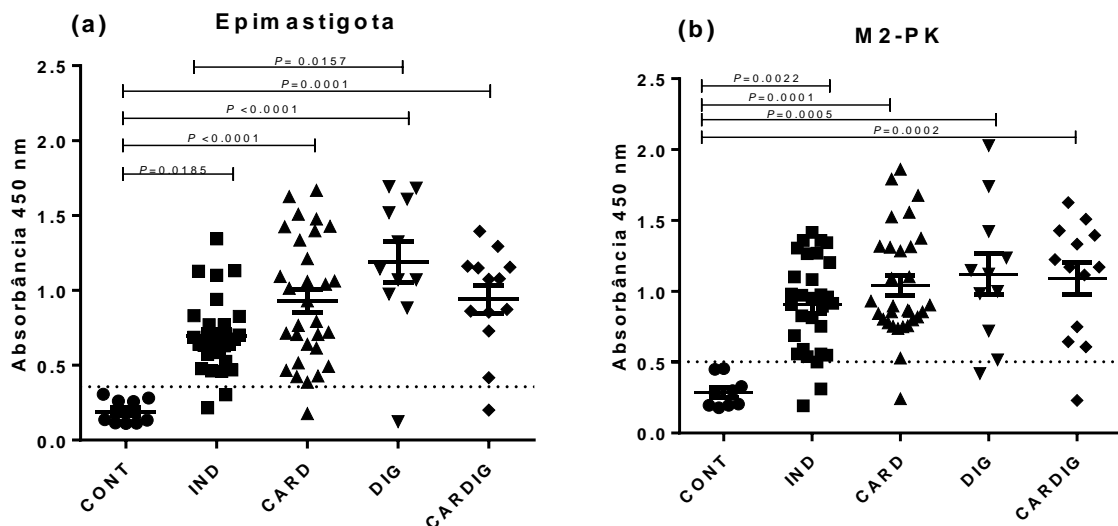
96A, *Shenzhen*, China), e os resultados foram expressos em absorbância. O *cut-off* foi calculado usando a absorbância média dos controles negativos (indivíduos não-infectado) e dois desvios-padrão.

### 3.5 Análise estatística

Todas as análises foram realizadas aplicando o programa estatístico *Instat* e o software PRISM® 7.0 (*GraphPad, San Diego, CA, USA*). Para a verificação da distribuição normal dos dados, foram empregados os testes *Agostino-Pearson*, *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. Em grupos com distribuição normal, foram empregados os testes ANOVA e *Tukey-Kramer* para a determinação da expressão da proteína recombinante M2-piruvato quinase e autoanticorpos contra a proteína avaliada (M2-piruvato quinase) em soros de pacientes chagásicos crônicos. Os testes *Kruskall-Wallis* e *Dunns*, foram empregados quando não houve distribuição normal desses dados. A correlação entre o grau de dilatação do esôfago ou cólon com os marcadores foram realizados através do teste não paramétrico de *Spearman*. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de  $p$  foi menor ou igual que 0,05 ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4. RESULTADOS

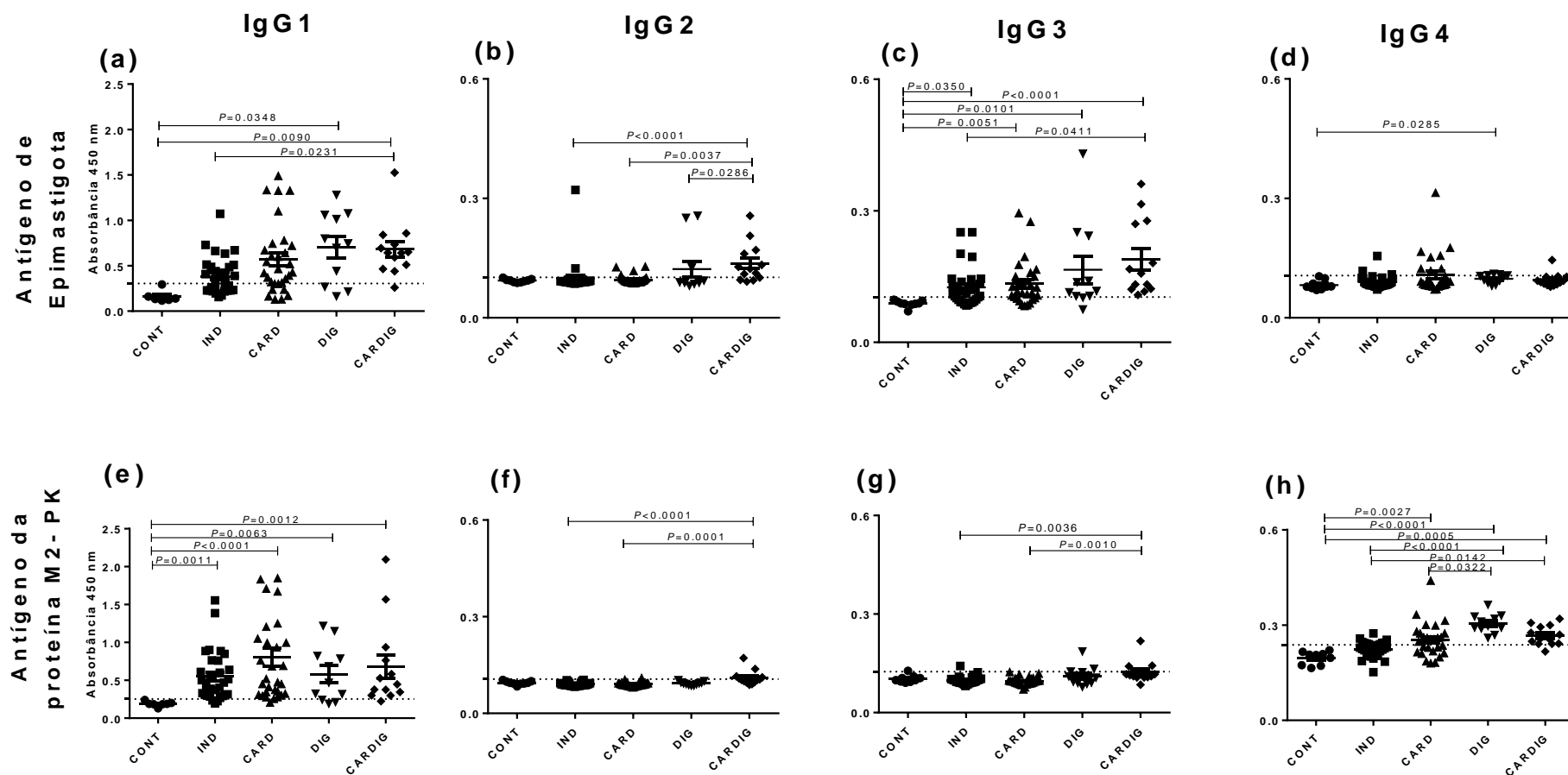
Inicialmente, a produção de IgG total foi quantificada e verificada intensa produção de imunoglobulinas no grupo de pacientes com doença de Chagas em comparação ao grupo de indivíduos controles saudáveis. Pacientes chagásicos crônicos apresentam maior produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e autoanticorpos anti M2-PK quando comparado a indivíduos não infectados (**Figura 4a e 4b**). Ainda, pacientes com a forma digestiva produziram mais anticorpos específicos anti-*T.cruzi* que pacientes com a forma indeterminada da doença (**Figura 4a**). Todos os grupos de pacientes chagásicos apresentaram concentrações similares de autoanticorpos IgG total anti M2-piruvato quinase (M2-PK) (**Figura 4b**).



**Figura 4** - Concentração de IgG total anti-epimastigota e M2-PK do soro dos indivíduos controles negativos (CONT, n=30) e pacientes chagásicos com a forma indeterminada (IND, n=30), cardíaca (CARD, n=30), digestiva (DIG, n=15) e cardiodigestiva (CARDIG, n=15). Os resultados individuais para cada participante são apresentados como significativos  $\pm$  SEM. Em cada grupo está relacionado à média da absorbância medida pelo leitor de placas em absorbância de 450nm. As diferenças estatísticas de cada grupo são mostradas por meio de  $P \leq 0,05$  (Dunns).

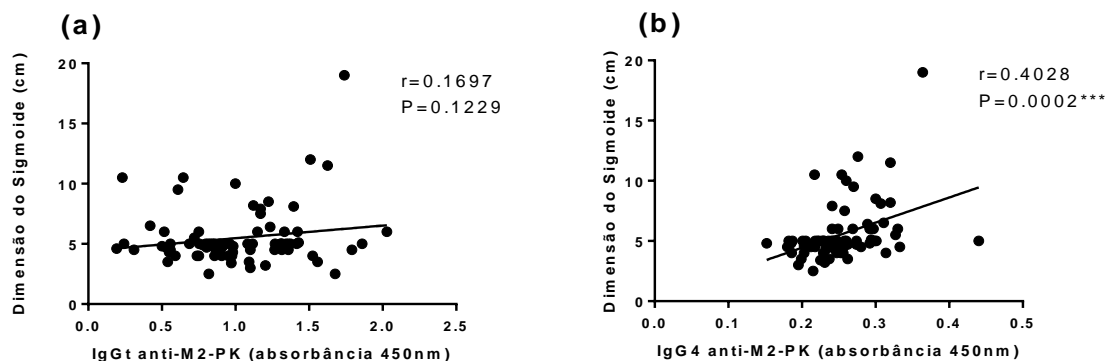
A análise dos isotipos (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) de anticorpos específicos contra antígenos de epimastigota demonstrou que pacientes portadores da forma cardiodigestiva apresentam maior produção de IgG1, IgG2 e IgG3, quando comparado a pacientes com a forma indeterminada da doença (**Figura 5a, Figura 5b, Figura 5c**). Ainda, pacientes com a forma digestiva apresentaram maior

produção de IgG4 que indivíduos controles não infectados (**Figura 5d**). Pacientes chagásicos, independente da forma clínica apresentada, produzem altos níveis de autoanticorpos anti M2-PK do isotipo IgG1 quando comparado a indivíduos controles (**Figura 5e**). Pacientes cardiodigestivos produzem quantidades aumentadas de autoanticorpos anti M2-PK dos isotipos IgG2 e IgG3 que pacientes com as formas indeterminada e cardíaca da doença (**Figura 5f, Figura 5g**). De forma interessante, pacientes portadores das formas digestiva da doença de Chagas apresentam maior produção de autoanticorpos anti M2-PK pertencente ao isotipo IgG4, quando comparado a pacientes portadores da forma indeterminada, cardíaca e cardiodigestiva da doença (**Figura 5h**).

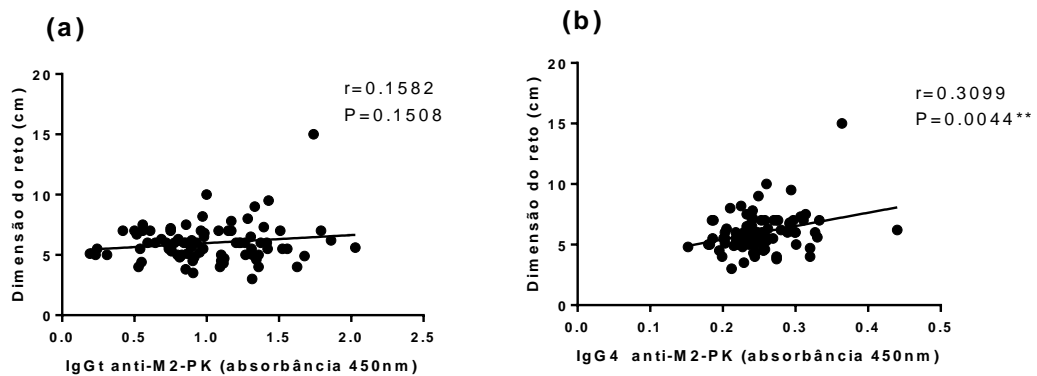


**Figura 5** - Concentração dos isotipos de IgG específicos (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) anti-epimastigota e M2-PK do soro dos indivíduos controles negativos (CONT, n=30) e pacientes chagásicos crônicos com a forma indeterminada (IND, n=30), cardíaca (CARD, n=30), digestiva (DIG, n=15) e cardiodigestiva (CARDIG, n=15). Os resultados individuais para cada participante são apresentados como significativos  $\pm$  SEM. Em cada grupo está relacionado à média da absorbância medida pelo leitor de placas em absorbância de 450nm. As diferenças estatísticas de cada grupo são mostradas através de  $P \leq 0,05$  (Dunns).

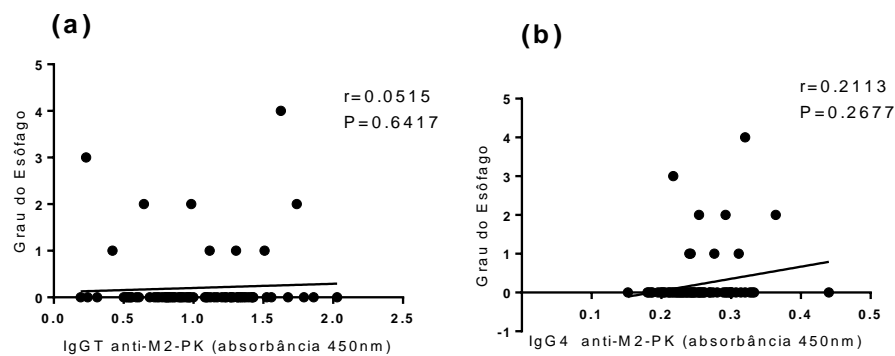
Com intuito de verificar a participação de autoanticorpos anti M2-PK no desenvolvimento das lesões do trato digestivo na doença de Chagas foram realizadas correlações entre a dimensão da região do esôfago, reto e do sigmoide no intestino grosso e a produção de anticorpos IgG total e isotipos específicos anti-*T cruzi* e autoanticorpos anti M2-PK com o teste de *Spearman*. Não foi observada correlação significativa entre o tamanho do sigmoide e a produção de autoanticorpos IgG total anti M2-PK (**Figura 6a**). Por outro lado, houve correlação positiva significativa entre o tamanho do sigmoide e a produção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK (**Figura 6b**). De maneira similar ao observado para o sigmoide, não foi observada correlação significativa com a produção de autoanticorpos IgG total anti M2-PK (**Figura 7a**). Entretanto, houve correlação positiva significativa entre a dimensão do reto e a produção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK (**Figura 7b**). Não foram observadas correlações significativas entre o grau do esôfago com a produção de autoanticorpos IgGt anti M2-PK (**Figura 8a**) e nem IgG4 (**Figura 8b**). Grau do esôfago, a dimensão do sigmoide e do reto com a produção de autoanticorpos IgG1, IgG2 e IgG3 anti M2-PK (dados não apresentados) também não obtiveram correlações significativas.



**Figura 6** - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Dimensão do sigmoide (cm) de (a) e (b). O teste de correlação de classificação de *Spearman* considerou-se significativo quando o valor de P era \*\*\* $P \leq 0,05$ .



**Figura 7** - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Dimensão do reto (cm) de (a) e (b). O teste de correlação de classificação de *Spearman* considerou-se significativo quando o valor de P era  $^{**}P \leq 0,05$ .



**Figura 8** - Correlação entre as imunoglobulinas de IgGt (a) e isotipo IgG4 (b) contra os níveis anti M2-PK comparados aos parâmetros da função digestiva dos pacientes chagásicos crônicos com as formas IND, CARD, DIG e CARDIG. Grau do esôfago de (a) e (b). A linha representa a regressão linear da comparação. O teste de correlação de classificação de *Spearman* considerou-se significativo quando o valor de P era  $P \leq 0,05$ .



## 5. DISCUSSÃO

No presente estudo avaliamos o envolvimento da produção de autoanticorpos anti M2-piruvato quinase (M2-PK) e a possível associação com o desenvolvimento e/ou diagnóstico da forma digestiva da doença de Chagas. Pacientes chagásicos apresentam elevada produção de autoanticorpos anti M2-PK comparado a indivíduos saudáveis, e ainda, aqueles portadores da forma digestiva da doença de Chagas apresentam maior produção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK quando comparado a pacientes cardíacos, indeterminados e ao grupo controle saudável.

Alguns estudos avaliaram a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e autoanticorpos durante a fase crônica da doença de Chagas em pacientes portadores de diferentes formas clínicas (TIBBETTS *et al.*, 1994; MORGAN *et al.*, 1998; D'AVILA *et al.*, 2009; GUEDES, 2012), e também proteínas solúveis no sangue (BASQUIERA *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2005; SARAVIA *et al.*, 2011; NUNES *et al.*, 2013; KEATING *et al.*, 2015), contudo estudos correlacionando a produção de autoanticorpos ao desenvolvimento da forma digestiva da doença de Chagas são raros (GOIN *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2009; HUBBALL *et al.*, 2012; NUNES *et al.* 2013).

Inicialmente, foi quantificada a produção de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* utilizando antígeno solúvel de formas epimastigotas do parasito, sendo observada alta produção de imunoglobulinas em pacientes chagásicos quando comparado a indivíduos não infectados. Baixos títulos de IgG total específico anti-*T. cruzi* foram descritos em pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas, enquanto pacientes sintomáticos portadores das formas cardíaca, digestiva e cardiodigestiva da doença apresentam exacerbada resposta imune humoral (MONTEÓN-PADILLA *et al.*, 1999, 2000; NUNES *et al.*, 2013). Sugerindo que anticorpos específicos anti-*T. cruzi* podem contribuir para a fisiopatologia da doença. De maneira interessante, pacientes com a forma digestiva apresentaram maior produção de IgG total quando comparado a pacientes com a forma indeterminada. A maior produção de IgG total específico anti-*T. cruzi* em pacientes chagásicos com a forma digestiva foi descrita na literatura (NUNES *et al.*, 2013), estando de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Estudo internacional multicentro para validação da qPCR para quantificação da parasitemia em pacientes chagásicos crônicos, realizado na Argentina sob coordenação da Organização Mundial de Saúde demonstrou que pacientes chagásicos portadores da forma digestiva, provenientes do Estado do Rio Grande do Norte - Brasil, Argentina e Espanha, apresentam maior parasitismo sanguíneo quando comparado a pacientes com a forma cardíaca e indeterminada (RAMIREZ *et al.*, 2015).

A elevada produção de IgG total em pacientes chagásicos portadores da forma digestiva da doença de Chagas pode ser devido a maior carga parasitária e estimulação de linfócitos T e B, conduzindo a maior produção de anticorpos. Efetivamente, a carga parasitária tem mostrado importante no mecanismo de lesão do sistema digestivo na infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos infectados com inóculos crescentes da cepa Y do *T. cruzi* apresentaram progressivamente maior inflamação, destruição tecidual com perda da inervação entérica e diminuição da motilidade intestinal (MOREIRA *et al.*, 2010; VAZQUEZ *et al.*, 2015; DE MELO MEDEIROS *et al.*, 2010). A literatura mostra que a denervação mioentérica durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* é resultado da produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  com consequente ativação da enzima iNOS e produção de óxido nítrico (ARANTES *et al.*, 2004).

No presente estudo foi observada a produção de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 específicas anti-*T. cruzi* em todos os grupos de pacientes chagásicos, sendo detectado alta produção de IgG1 e IgG3 e menor produção de IgG2 e IgG4. Dados da literatura demonstram resultados similares, com níveis elevados dos isotipos IgG1 e IgG3, seguidos com níveis mais baixos nos soros dos isotipos IgG2 e IgG4, em pacientes crônicos chagásicos (CERBAN *et al.*, 1993; D' AVILA *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2013). IgG1 auxilia a lise de formas tripomastigotas por meio da ligação da proteína C1q e a fagocitose por macrófagos, enquanto IgG2 está envolvido com a imunidade mediada por células efectoras não fagocitárias (FANGER *et al.*, 1991).

Nossos resultados mostram maior produção de IgG1, IgG2 e IgG3 em pacientes cardiodigestivos, quando comparado a pacientes portadores da forma indeterminada da doença. Dados da literatura demonstram a presença de níveis semelhantes de produção dos diferentes isotipos de imunoglobulinas em pacientes chagásicos portadores das diferentes manifestações clínicas da doença. Não sendo

possível utilizar estes anticorpos como marcadores de progressão da doença ou para as formas clínicas (D'AVILA *et al.*, 2009; CERBAN *et al.*, 1993). Entretanto, outros estudos utilizando antígeno de formas epimastigotas demonstraram altos níveis de IgG total, IgG3 (NUNES *et al.*, 2013) e IgG2 (MORGAN *et al.*, 1996; HERNANDEZ-BECERRIL *et al.* 2001) anti-*T.cruzi* no soro de pacientes chagásicos crônicos portadores da forma cardíaca quando comparado a pacientes com a forma indeterminada. Ainda, utilizando antígeno de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, dados da literatura demonstraram alta produção de IgG total, IgG1 e IgG2 em pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica quando comparado a pacientes com a forma indeterminada da doença de Chagas (NUNES *et al.*, 2013). A presença de maior quantidade de imunoglobulinas em pacientes chagásicos crônicos sintomáticos em comparação com aqueles portadores da forma indeterminada poderia refletir maior carga parasitária ou exacerbada resposta inflamatória contribuindo para maior patologia cardíaca.

A produção de todos os isotipos de IgG indica a presença de resposta imune mista entre linfócitos auxiliares tipos Th1 e Th2. A produção de imunoglobulinas é estimulada por meio de citocinas pertencentes aos perfis Th1 e 2 de diferenciação de linfócitos T CD4 (REIS *et al.*,1997; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*,1998; ABEL *et al.*,2001; GOMES *et al.*,2003; GUTIERREZ *et al.*, 2009). A produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (perfil Th1), induzirão a produção de IgG1 e IgG3, enquanto citocinas anti-inflamatórias, IL-4 e IL-10 (perfil Th2), promoverão a produção de IgG2 (BRIERE *et al.*, 1994; KAWANO *et al.*, 1994). Em pacientes, IgG1 e IgG2 correspondem a aproximadamente 90% do total de imunoglobulina G produzida (WATTHANAKULPANICH *et al.*, 2008). Trabalhos recentes demonstram a presença de linfócitos T reguladores, Th9, Th17 e Th22 em pacientes chagásicos crônicos (GUEDES *et al.*, 2012, 2016). O mecanismo pelo qual as citocinas produzidas por estas respostas imunológicas poderiam influenciar a produção de imunoglobulinas em pacientes chagásicos ainda não foi demonstrado.

Neste estudo foi observada produção alta e semelhante de autoanticorpos IgG total anti M2-PK em todos os grupos de pacientes chagásicos. A proteína M2-PK está presente em tecidos proliferativos e indiferenciados, encontrada também em leucócitos em degradação, aumentando durante o processo inflamatório (EIGENBRODT & GLOSSMANN, 1980; HARDT *et al.*, 2000; EBERL & LOCHNER,

2009). Pacientes chagásicos crônicos apresentam maior inflamação tecidual que indivíduos do grupo controle (GUEDES *et al.*, 2016), o que induziria maior liberação de M2-PK e consequentemente maior formação de autoanticorpos anti M2-PK. M2-PK dimérico nuclear fosforila diretamente STAT3, gerando produção de citocinas inflamatórias (GAO, *et al.*, 2012). A inflamação é uma reação complexa que começa com a ativação dos leucócitos residentes (macrófagos e células dendríticas) e conduz a ativação de linfócitos T e B com produção de citocinas e anticorpos (KOTA E MEDZHITOV, 2015), envolvendo intensivo gasto energético pelas células implicando mudança dramática do estado metabólico de repouso para estado metabólico altamente ativo. Esta reprogramação metabólica direciona nutrientes para a geração eficiente de ATP e síntese de macromoléculas que são necessárias na produção de mediadores pró-inflamatórios, rearranjo do citoesqueleto e proliferação por células imunes. Desta forma, células inflamatórias altamente ativas toleram mudança metabólica da fosforilação oxidativa para a glicólise anaeróbica (ALVES-FILHO E PÅLSSON-MCDERMOTT, 2016).

Enzimas metabólicas, como M2-PK, e reguladores também apresentam papéis críticos na regulação das funções das células imunes (LUO E SEMENZA, 2012; IQBAL *et al.*, 2014). A expressão de M2-PK é fortemente aumentada em macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (LPS) (PÅLSSON-MCDERMOTT *et al.*, 2015; SHIRAI *et al.*, 2016), a M2-PK transloca para o núcleo e forma um complexo transcricional com HIF-1 $\alpha$  que se liga diretamente ao gene do promotor IL-1 $\beta$  ativando a transcrição, contribuindo para a geração da inflamação (PÅLSSON-MCDERMOTT, *et al.*, 2015; ALVES-FILHO E PÅLSSON-MCDERMOTT, 2016).

Além disso, a ativação de células de carcinoma colorretal com LPS resulta em uma produção aumentada de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  de uma maneira dependente de M2-PK/STAT3. Mecanicamente, LPS induz a translocação nuclear de M2-PK e a ligação ao promotor STAT3, aumentando a transcrição e posterior ativação (YANG, 2015).

Estudo recente também implicou papel crítico para M2-PK no comportamento hiperinflamatório de macrófagos de pacientes com doença arterial coronariana (DAC) (SHIRAI *et al.*, 2016). Assim, M2-PK parece ser um regulador crítico da expressão e secreção de mediadores pró-inflamatórios, havendo a possibilidade de direcionar essa proteína no tratamento de doenças inflamatórias e infecciosas, bem como a utilização de autoanticorpos anti M2-PK no diagnóstico de doenças infecciosas e inflamatórias.

Análise da produção dos isotipos de IgG anti M2-PK demonstrou que pacientes chagásicos que apresentam as formas digestiva e cardiodigestiva da doença de Chagas produzem altos níveis de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK no soro, quando comparado a pacientes com as formas cardíaca, indeterminada e indivíduos não infectados. Ainda, apresentaram correlação positiva entre a produção de IgG4 e a dimensão do sigmoide e do reto. Dados da literatura demonstram elevada produção de IL-10 em pacientes com a forma digestiva, podendo contribuir para maior produção de IgG4 (LUNDGREN *et al.*, 1989; RIBEIRO *et al.*, 2008; PISSETI *et al.*, 2009; GUEDES *et al.*, 2012; 2016).

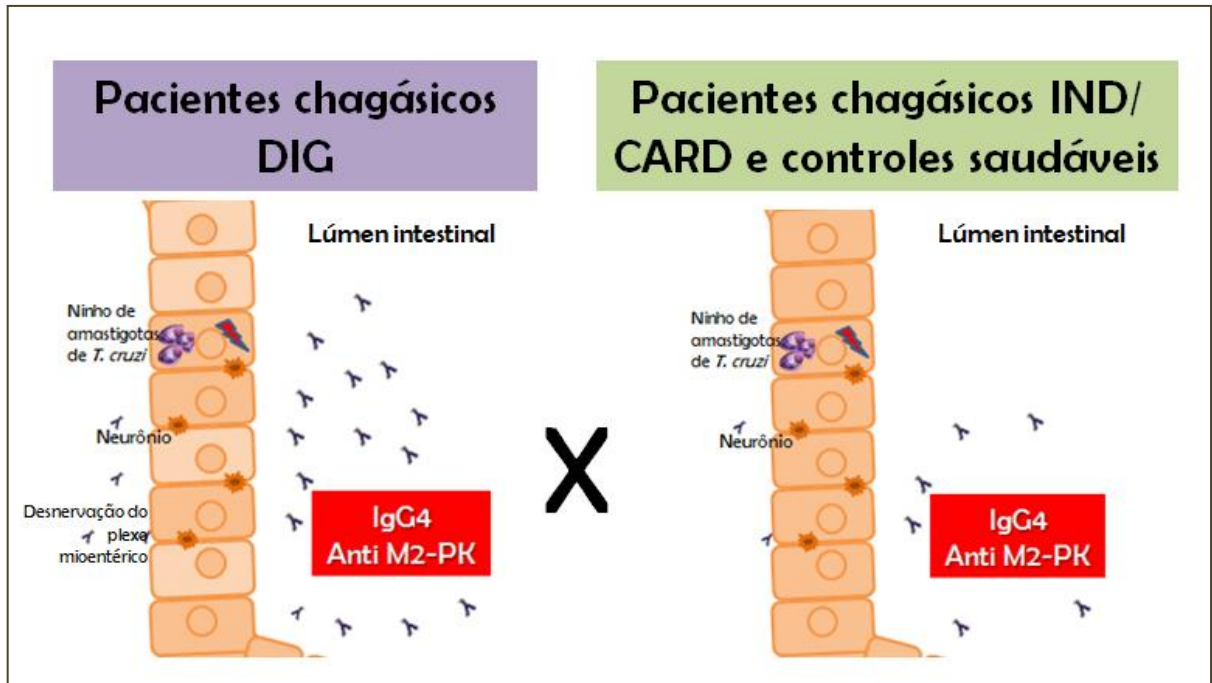
A presença de anticorpos anti M2-PK pode estar associada à degeneração neuronal observada em pacientes chagásicos. Dados da literatura demonstram que a incubação em longo prazo (24h) de fibras do músculo estriado esquelético de rato com anticorpos anti M2-piruvato quinase leva ao bloqueio parcial dos canais de K<sup>+</sup> sensíveis a ATP e consequente redução de diâmetro e atrofia muscular (MELE *et al.*, 2012). Ainda, estes autores demonstraram que a utilização de autoanticorpos anti M2-PK em linhagem celular de neuroblastoma humano (SH-SY5Y) induz morte celular, demonstrando que autoanticorpos anti M2-PK induzem morte neuronal e poderiam contribuir para o processo de denervação do plexo entérico.

O aumento da expressão de M2-PK foi descrito para ampla gama de tumores presentes em pacientes, como no câncer de próstata (WONG *et al.*, 2014), câncer colorretal (ZHOU *et al.*, 2012), câncer de ovário (KOBIERZYCKI *et al.*, 2018), câncer de esôfago (ZHAN *et al.*, 2013) podendo ser utilizado como marcador clínico para o câncer, e doenças inflamatórias intestinais (DI RUSCIO *et al.*, 2017) doença de Crohn e colite ulcerativa (DAY *et al.*, 2012). A proteína M2-PK tem sido detectada no tecido de órgãos com a presença de tumor e ainda em amostras de sangue e fezes. O método de ELISA *sandwich* para detecção de M2-PK tem sido utilizado para fazer levantamento de casos de câncer colorretal (HARDT *et al.*, 2003, 2004; VOGEL *et al.*, 2005).

A proteína M2-PK permanece estável nas fezes por até dois dias a temperatura ambiente e até um ano a -20°C (KANAOKA *et al.*, 2004; DAVIDSON *et al.*, 1995). O período de detecção do anticorpo anti M2-PK na circulação e nas fezes seria ainda maior que o apresentado pela proteína devido à estabilidade. Anticorpos antienzimas glicolíticas, tais como piruvato quinase e álcool desidrogenase, foram descritos em pacientes com candidíase oral e esofágica (SWOBODA *et al.*, 1993). A

determinação do acometimento do esôfago e cólon em pacientes chagásicos acontece por meio de exames invasivos e incômodos e que na maioria dos casos não são realizados, permitindo que o paciente evolua para quadro mais grave da doença. O autoanticorpo IgG4 anti M2-PK demonstrou ser marcador molecular promissor para auxiliar o diagnóstico da forma digestiva da doença de Chagas, podendo auxiliar a redução da morbimortalidade associada a forma clínica. Os distúrbios na motilidade do trato gastrointestinal observados em pacientes chagásicos crônicos são morfologicamente expressos como hipertrofia da parede muscular seguida de dilatação do órgão e denervação do sistema nervoso entérico. A destruição ocasiona danos na coordenação motora, acalasia esfincteriana, retenção de alimentos no esôfago e de fezes no reto e no cólon sigmoide, além da hipertrofia muscular seguida de dilatação dos órgãos e, na forma mais grave, causa desnutrição e constipação intratável (OLIVEIRA *et al.*, 1998; MONCAYO, 1999).

No presente estudo os autoanticorpos IgG4 anti M2-PK demonstraram ser marcador molecular promissor para auxiliar o diagnóstico não invasivo da forma digestiva, podendo auxiliar a redução da morbimortalidade associada a esta forma clínica da doença de Chagas. Logo, autoanticorpos anti M2-PK poderiam contribuir para aumentar o processo inflamatório gerado no trato gastrointestinal além de poder também contribuir diretamente para o processo de denervação do plexo mioentérico participando da gênese das lesões do sistema digestivo na doença de Chagas (**Figura 10**).



**Figura 9** – Modelo esquemático proposto da participação de autoanticorpos anti M2 piruvato quinase em pacientes chagásicos crônicos. Pacientes portadores da forma digestiva da doença de Chagas apresentam maior produção de autoanticorpos anti IgG4 anti M2-PK quando comparado a pacientes cardíacos, indeterminados e indivíduos saudáveis.

## **6. CONCLUSÃO**

Os resultados indicam que a detecção de autoanticorpos IgG4 anti M2-PK é um método promissor não invasivo no diagnóstico do acometimento do sistema digestivo na doença de Chagas e a presença ainda pode estar envolvida no desenvolvimento da forma digestiva da doença.



## REFERÊNCIAS

AALBERSE, R. C et al. Immunoglobulin G4: an odd antibody. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p. 469-77, 2009.

ABEL, L.C. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- $\gamma$  response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n.1, p 99–107, 2001.

ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma and IL-12 regulate innate and acquired immunity infection. **Experimental Parasitology**, v. 84, p231- 44, 1996.

ADJOBIMEY, T; HOERAUF, A. Induction of immunoglobulin G4 in human filariasis: an indicator of immunoregulation. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 104, p. 455-64, 2010.

ALIBERTI, J.C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and Immunity** v.64, p1961-7, 1996.

ALMEIDA, D.R. et al. Fisiologia e tratamento da insuficiência cardíaca. **CardiologiaIntensiva**, v.13, p 11- 39, 2002.

ALVES-FILHO, J.C; PALSSON-MCDERMOTT, E. M. Pyruvate Kinase M2: A Potential Target for Regulating Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 21, p. 145, 2016.

ANDRADE, C.M. et al .Chagas disease: morbidity profile in an endemic area of Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, p706-15, 2015.

ANDRADE, D.V; GOLLOB, K.J; DUTRA, W.O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8,p e3010, 2014.

ANDRADE, Z.A. Patologia da doença de Chagas. *In*: Brener Z; Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p 201-30, 2000.

ARANTES, R. M. et al. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **The American Journal of Pathology**, v. 164, p 1361-8, 2004.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. et al. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 3, p 127-131, 1998.

BARRETT, M.P. et al. The trypanosomiasis. **Lancet**, v.362, p 1469–1480, 2003.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G. et al. IFN- $\gamma$  in human Chagas' disease: protection or pathology? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p 127–131, 1998.

BASQUIERA, A.L. et al. Serum troponin T in patients with chronic Chagas disease. **Revista Española de Cardiología**, v. 56, p742-4, 2003.

BAVEYE, S. et al. Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein involved in the modulation of the inflammatory process. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v 37, p 281–6, 1999.

BOES, M. Role of natural and immune IgM antibodies in immune responses. **Molecular Immunology**, v. 37, p. 1141-9. 2000.

BONNEY, K.M. Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? **Parasite** , v. 21, p. 11, 2014.

BONNÍN, A.T; VILA, V.M.; ROSELL, C.A. Fecal calprotectin as a biomarker to distinguish between organic and functional gastrointestinal disease. **Revista Espanola de Enfermedades Digestivas (Madrid)**, v. 99, p 689–93, 2007.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 114, p 103-10, 1997.

BRITO, C.R et al. Seroepidemiology of *Trypanosoma cruzi* infection in the semiarid rural zone of the State of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p 346-52, 2012.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Revistado Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, p 227-35, 1966.

CAMARGO, M.E.; TAKEDA, G.K.F. Diagnóstico de Laboratório. In: *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas (Z. Brener & Z. Andrade). **Ed Guanabara Koogan**, p. 175-198, 1979.

CAMPOS, C.F. et al. Enteric Neuronal Damage, Intramuscular Denervation and Smooth Muscle Phenotype Changes as Mechanisms of Chagasic Megacolon: Evidence from a Long-Term Murine Model of *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One**, v. 11, p e0153038, 2016.

CERBAN, F.M., et al. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 67, p 25– 30, 1993.

CERISOLA, J.Á. et al. El xenodiagnóstico. Buenos Aires: **Imp Inst Nac Invest Cardiovasc**, 1974.

CERUTTI, A. et al. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p 118-132, 2013.

CHAGAS, C.; VILLELA, E. Forma cardíaca da Trypanosomíase Americana. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.14, p 5-61, 1922.

CHAGAS, C. Nova trypanozomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, N. Gen, N. sp., o agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p 159-218, 1909.

CHAGAS, C. Tripanosomíase Americana. Forma aguda da moléstia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 8, p 37-65, 1916.

CHANG, T.W et al. Anti-IgE antibodies for the treatment of IgE-mediated allergic diseases. **Advances in Immunology** , v. 93, p. 63 -119, 2007.

CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p.19-23, 1989.

CHIARI, E. ;BRENER, Z. Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, p. 134-138, 1966.

CHUNG-FAYE, G. et al. Fecal M2- pyruvate kinase (M2-PK): a novel marker of intestinal inflammation. **Inflammatory Bowel Diseases Journal**, v. 13, p 1374–8, 2007.

CORDEIRO, F.D. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of humam Chagas' disease. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.8, p 112–118, 2001.

CORTHESEY, B. Roundtrip ticket for secretory IgA: role in mucosal homeostasis? **Journal of Immunology**, v. 178, p. 27-32, 2007.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity. **Advances in parasitology**, v.72, p. 129-52, 2011.

CUNHA-NETO, E. et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, p 3541–3545, 1995.

CZUB, E. et al. Fecal pyruvate kinase: a potential new marker for intestinal inflammation in children with inflammatory bowel disease. **Journal Gastroenterol**, v. 42, p 1147–50, 2007.

DAVIDSON, L. A. et al. Noninvasive detection of putative biomarkers for colon cancer using fecal messenger RNA. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 4, p. 643-7, 1995.

D'AVILA, D. A. et al. Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p 100-105, 2009.

DAY, A.S. et al. Fecal M2-PK in children with Crohn's disease: a preliminary report. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 57, p 2166-2170, 2012.

DE FARIA, C.R; DE REZENDE, J.M; RASSI, A. Peripheral denervation in the various clinical forms of Chagas' disease. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v. 46, p 225–237, 1988.

DE MELO MEDEIROS, M. et al. *Trypanosoma cruzi* infection: do distinct populations cause intestinal motility alteration? **Parasitology Research** , v. 107, p 239-42, 2010.

DESAI, D.; FAUBION, W.A.; SANDBORN, W.J. Review article: biological activity markers in inflammatory bowel disease. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, p 247–55, 2007.

DI RUSCIO, M. et al. Surrogate Fecal Biomarkers in Inflammatory Bowel Disease: Rivals or Complementary Tools of Fecal Calprotectin? **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 24, p. 78-92, 2017.

DIAS, J.C. et al. Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Epidemiologia e Serviço de Saúde**, v.25 p 7-86, 2016.

DIAS, J.C.P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease a clinical epidemiological review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p 147-156, 1989.

DIGNASS, A. Second European evidence- based consensus on the diagnosis and management of ulcerative colitis. 1. Definitions and diagnosis. **Journal of Crohn's& Colitis**, n. 6, p 965–990, 2012.

DONG, G. et al. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. **Oncology Letters**, v.11, p k1980-1986, 2016.

EBERL, G.; LOCHNER, M. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. **Mucosal Immunology**, v. 2, n 478-485, 2009.

EIGENBRODT, E.; GLOSSMANN, H. Glycolysis—one of the keys to cancer? **Trends PharmacolSci**, v. 1, p 240–5, 1980.

ENGEL, M. Phosphoglycerate mutase derived polypeptide inhibits glycolytic flux and induces cell growth arrest in tumor cell lines. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p 35803–12, 2004.

ESCOBAR, A.L.. et al. IgGs and Mabs against the beta2-adrenoreceptor block A-V conduction in mouse hearts: A possible role in the pathogenesis of ventricular arrhythmias. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 40, p 829–837, 2006.

FANGER, M. W. et al. Bispecific antibodies and targeted cellular cytotoxicity. **Immunology Today**, v. 12, p. 51-4. 1991.

FIGUEIRÊDO, S. S. et al. A. Caracterização radiográfica das manifestações esôfago gastrointestinais da doença de Chagas. **Radiologia Brasileira**, v. 35, n.5, 2002.

FRITZLER, M..J. Challenges to the use of autoantibodies as predictors of disease onset, diagnosis and outcomes. **Autoimmunity Reviews**, v. 7, p 616–620, 2008.

GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p 895-906, 2006.

GEISBERGER, R; LAMERS, M; ACHATZ, G. The riddle of the dual expression of IgM and IgD. **Immunology**, v. 118; p. 429-37, 2006.

GLEICHER, N.; BARAD, D.; WEGHOFER, A. Functional autoantibodies. A new paradigm in autoimmunity? **Autoimmunity Reviews**, v 7, p 42– 45 26, 2007.

GOMES, J.Á. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, p 1185–1193, 2003.

GONZALEZ, S.F. et al. Trafficking of B cell antigen in lymph nodes. **Annual Review of Immunology**, v. 29, p 215-233, 2011.

GUEDES, P. M. M. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas'disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1630, 2012.

GUEDES, P.M.M. et al. Inflammation Enhances the Risks of Stroke and Death in Chronic Chagas DiseasePatients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, p. e0004669, 2016.

HARDT, P.D. et al. Fecal pyruvate kinase concentrations (ELISA based on a combination of clone 1 and clone 3 antibodies) for gastric cancer screening. **Anticancer Research**, v. 23, p. 855-7, 2003.

HARDT, P.D. et al. Faecal tumour M2 pyruvate kinase: a new, screening tool for colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 91, p 980–4, 2004.

HARDT, P.D.,et al. Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in the diagnosis of gastrointestinal cancer. **Anticancer Research**, v. 20, p 5151–4, 2000.

HENTZE MW. Enzymes as RNA-binding proteins: a role for (di)nucleotide-binding domains? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 19, p 101–3, 1994.

HERNÁNDEZ-BECERRIL, N. et al. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. **Archivos de Cardiologia de Mexico**, v. 71, p 199–205, 2001.



HIGUCHI, M.L. et al. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, p 101-5, 1993a.

HIGUCHI, M.L, et al. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human choronic Chagas disease myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Archiv A Pathological Anatomy and Histopathology**, v. 423, p 157-60, 1993b.

HYLAND, K.V et al. Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infection and Immunity**, v.75, p.3641-3650, 2007.

IQBAL, M. A. et al. Missense mutations in pyruvate kinase M2 promote cancer metabolism, oxidative endurance, anchorage independence, and tumor growth in a dominant negative manner. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 8098-105, 2014.

IWASAKI A. Mucosal dendrítica cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p 381-418, 2007.

JEFFERIS, R; KUMARARATNE D.S. Selective IgG subclass deficiency: quantification and clinical relevance. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 81, p. 357-67,1990.

KANE, S.V. et al. Fecal lactoferrin is a sensitive and specific marker in identifying intestinal inflammation. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p 1309–14, 2003.

KANAOCA, S. et al. Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening. **Gastroenterology**, v. 127, p. 422-7, 2004.

KEATING, S.M. et al. Inflammatory and cardiac biomarkers are differentially expressed in clinical stages of Chagas disease. **International Journal of Cardiology**, v. 199, p 451-9, 2015.

KIERSZENBAUM, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? **Trends in Parasitology**, v. 21, p 513–516, 2005.

KIRCHHOFF, L.V. Epidemiology of American trypanosomiasis (Chagas disease). **Advances in Parasitology**, v. 75, p 1–18, 2011.

KOBIERZYCKI, C. et al. Correlation of Pyruvate Kinase M2 Expression with Clinicopathological Data in Ovarian Cancer. **Anticancer Research**, v. 38, p. 295-300, 2018.

KOTAS, M. E; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, p. 816-27, 2015.

KUIJPERS, T. W; WEENING, R. S; OUT, T. A. IgG subclass deficiencies and recurrent pyogenic infections, unresponsiveness against bacterial polysaccharide antigens. **Allergol Immunopathol (Madr)**, v. 20, p. 28–34, 1992.

LANG, R.M. et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. **Journal American Society of Echocardiography**, v. 18, p 1440-63, 2005.

LIU, Z. K. et al. Role of interleukin- 12 in the induction of mucosal inflammation and abrogation of regulatory T cell function in chronic experimental colitis. **European Journal of Immunology**, v. 31, p 1550–1560, 2001.

LOWRY, O.H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p 265-75, 1951.

LUNDGREN, M. *et al.* Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. **European Journal of Immunology**, v. 19, p 1311–5, 1989.

LUO, W; SEMENZA, G. L. Emerging roles of PKM2 in cell metabolism and cancer progression. **Trends Endocrinology Metabolism**, v. 23, p. 560-6, 2012.

MACEDO, A.M; PENA, S.D.J. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitology Today** 14:119–124, 1998.

MACÊDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p 311-316, 1999.

MACÊDO, V. Influência da exposição à reinfecção na evolução da doença de Chagas (estudo longitudinal de cinco anos). **Revista de Patologia Tropical**, v. 5, p 33-116, 1976.

MACHADO, M.N. Positive troponin T in a chagasic patient with sustained ventricular tachycardia and no obstructive lesions on cine coronary angiography. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 84, p 182-4, 2005.

MAZUREK, S.; HUGO, F.; FAILING, K.; EIGENBRODT, E. Studies on associations of glycolytic and glutaminolytic enzymes in MCF-7 cells. Role of p36. **Journal Cellular Physiology**, v. 167, p 238–50, 1996.

MAZUREK, S. et al. Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic enzyme complex. **Biochemical Journal**, v. 356, p 247–56, 2001a.

MAZUREK, S. et al. Metabolic cooperation between different oncogenes during cell transformation: interaction between activated ras and HPV-16 E7. **Oncogene**, v. 20, p 6891–8, 2001b.

MAZUREK, S. Pyruvate kinase type M2: A key regulator of the metabolic budget system in tumor cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.43, p 969– 980, 2011.

MELE, A et al. Opening/blocking actions of pyruvate kinase antibodies on neuronal and muscular KATP channels. **Pharmacological Research**, v. 66, p. 401-8, 2012.

MENG, W. et al. Serum M2-pyruvate kinase: A promising non-invasive biomarker for colorectal cancer mass screening. **World Journal of Gastrointestinal Oncology**, v. 4, p 145-151, 2012.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 401-404, 1999.

MORGAN, J. et al. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. **The Journal of Parasitology** 84: 641-643, 1998.

MORGAN, J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.55, p. 355–359, 1996.

NEURATH, M.F. et al. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v.182, p 1281–1290, 1995.

NORMANSELL, D.E. Human immunoglobulin subclasses. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, p. 115-28, 1987.

NUNES, D.F et al. Troponin T autoantibodies correlate with chronic cardiomyopathy in human Chagas disease. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, p 1180-92, 2013.

OLIVEIRA, E.C. et al. Neuropathy of Gastrointestinal Chagas' Disease: Immune Response to Myelin Antigens. **Neuroimmunomodulation**, v.16, p 54-62, 2009.

OLIVEIRA, R.B. et al. Gastrointestinal manifestations of Chagas' disease. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 93, p 884–889,1998.

PALSSON – MCDEMOTT, E. M. et al. Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. **Cell Metabolism**, v. 21, p. 65-80, 2015.

PARANHOS, U. Considerações sobre o mal de engasgo ou dysphagia tropical. **Gazeta Clínica de São Paulo**, n.11, p.224-225, 1913.

PEREZ-LOPEZ, A. et al. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nature Reviews Immunology**, v.16, p 135-48, 2016.

PIFANO, F.C. El diagnóstico parasitológico de la enfermedad de Chagas en fase crónica. Estudio comparativo entre la gota gruesa, el xenodiagnóstico, el hemocultivo y las inoculaciones experimentales en animales sensibles. **Archivos Venezolano de Patología Tropical**, v. 2, p.89-120, 1954.

PISSETTI, C.W, et al. Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p 425-430, 2009.

PLOMP, R. et al. Subclass-specific IgG glycosylation is associated with markers of inflammation and metabolic health. **Scientific Reports**, v. 7, p. 12325, 2017.

RAMÍREZ, J.C. et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, p 605-15, 2015.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p 275–291, 2012.

RASSI, A. JR. Morte súbita na doença de Chagas. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 76, n 1, p 75-85, 2001.

RASSI A, et al. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2ª ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, p.231-45, 2000.

REIS, D.D.A, et al. Lymphocyte subsets in peripheral blood and esophagus of chronic chagasic patients bearing different stages of digestive disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p 44, 1996.

REIS, M.M, et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R/in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 83, p 165–172, 1997.

RESCIGNO, M.; DI SABATINO, A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, p 2441-2450, 2009.

REZENDE, J.M; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. *In*: Brener Z; Andrade Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, p 297-343, 2000.

REZENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: CASTRO, L.P., COELHO, L.G.V. **Gastroenterologia**, 1st ed. São Paulo: Medsi, p 325-391, 2004.

RIBEIRO, B.M; CREMA, E; RODRIGUES, V. Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. **Human Immunology**, v. 69, p 484-489, 2008.

RODRÍGUEZ-MORANTA, F., et al Fecal calprotectin in the diagnosis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology Hepatology**, v.36, p 400-6, 2013.

ROTTENBERG, M.E, *et al.* Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infection and Immunity**, v. 61, p 5129-33, 1993.

ROTTENBERG, M.E, et al. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 41, p 164-70, 1995.

SANOVIC, S.; LAMB, D.P; BLENNERHASSETT, M.G. Damage to the enteric nervous system in experimental colitis. **American Journal Pathology**, v.155, p 1051–1057, 1999.

SARAVIA, S.G. et al. Cardiac troponin T measured with a highly sensitive assay for diagnosis and monitoring of heart injury in chronic Chagas disease. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 135, p 243-8, 2011.

SCHOEPFER, A. M, et al. Fecal Calprotectin correlates more closely with the simple endoscopic score for Crohn's disease (SES-CD) than CRP, blood leukocytes, and the CDAI. **The American Journal of Gastroenterology**; 105:162–169, 2010.

SCHOEDER JR, H. W.; CAVACINI, L. Structure and Function of Immunoglobulins. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, 2010.

SHASTRI, Y.M, et al. Comparison of a novel fecal marker, fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) with fecal calprotectin in patients with inflammatory bowel disease: a prospective study. **Clinica y Laboratorio**, v. 54, p 389–90, 2008.

SHIRAIT, T. et al. The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 213, p. 337-54, 2016.

SHOENFELD, Y.et al. The mosaic of autoimmunity: prediction, autoantibodies, and therapy in autoimmune diseases—2008. **The Israel Medical Association Journal**, v. 10, p 13–19 25, 2008.

SIDDIQUI, I; MAJID, H; ABID, S. Update on clinical and research application of fecal biomarkers for gastrointestinal diseases. **World Journal of Gastrointestinal Pharmacology Therapeutics**, v. 8, p.39-46, 2017.

SILVA, J.S, et al. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v.175, p 169-74, 1992.

SILVA, J.S, et al. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infection and immunity**, v. 63, p 4862-7,1995.

SKYLLOURIOTIS, P., et al. IgG subclass reactivity to human cardiac myosin in cardiomyopathy patients is indicative of a Th1-like autoimmune disease. **Clinical & Experimental Immunology**, v.115, p 236–47,1999.

STROBER, W.; FUSS,I. J. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. **Gastroenterology**. v. 140, p 1756–1767, 2011.

SWOBODA, R.K.G. et al. Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 4263-71, 1993.



TARLETON, R.L, et al .Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, p 338-40,1992.

TARLETON,R.L. et al. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infection and immunity**, v. 62, p 1820-9, 1994.

TARLETON, R.L. Depletion of CD8<sup>+</sup> T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of immunology**, v. 144, p 717-24, 1990.

TARLETON RL. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitology Today**, v.11, p 7-9, 1995.

TIBBETTS, R.S, et al. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **The Journal of Immunology**, v.152, p. 1493-9,1994.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p. 472-481, 2001.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; STOLF A.M.S. Changes in isotype composition and antigen recognition of anti-T.cruzi antibodies from acute to chronic Chagas disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 10, p 407-413, 1996.

VALENZUELA, N.M, SCHAUB, S. The Biology of IgG Subclasses and Their Clinical Relevance to Transplantation. **Transplantation**, v. 102, p. S7-S13, 2018.

VAN ASSCHE, G., et al. The second European evidence-based consensus on the diagnosis and management of Crohn's disease. Definitions and diagnosis. **Journal Crohns Colitis**, v. 4, p 7–27, 2010.

VASCONCELOS, R.H.T., et al. Increased levels of IgA antibodies against CRA and FRA recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi* differentiate digestive forms of Chagas disease. **Human Immunology**, v. 71; p 964–967, 2010.

VAZQUEZ, B. P. et al. Inflammatory responses and intestinal injury development during acute *Trypanosoma cruzi* infection are associated with the parasite load. **Parasites and Vectors**, v. 3, p 206, 2015.

VILELA, E.M., et al. Anti-cardiac troponin antibodies in clinical human disease: a systematic review. **Annals of Translational Medicine**, v.5, p 307, 2017.

VOGEL, T. et al. Comparison of different stool tests for the detection of cancer of the colon. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 130, p. 872-7, 2005.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine: Theory and practice. **Bulletin World Health Organ**, v. 53, p 55-65, 1976.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis). Factsheet.** 2017. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> > Acesso em: 12 de fevereiro de 2018.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Record**, n. 6, p. 33-44, 2015.

WONG, N., et al. Changes in PKM2 associate with prostate cancer progression. **Cancer Investigation**, v. 32, p. 330-8, 2014.

YEH SP & LIAO YM. Gastric bleeding due to graft-vs-host disease. Discrepancy between endoscopic and histologic assessment. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 122, p 919–25, 2004.

YUI, S.; NAKATANI, Y.; MIKAMI, M. Calprotectin (S100A8/S100A9), an inflammatory protein complex from neutrophils with broad apoptosis-inducing activity. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p 753–60, 2003.

ZHAN, C. et al. Pyruvate kinase M2 is highly correlated with the differentiation and the prognosis of esophageal squamous cell cancer. **Diseases of the Esophagus**, v. 26, p. 746-53, 2013.

ZHOW, C et al. Pyruvate kinase type M2 is upregulated in colorectal cancer and promotes proliferation and migration of colon cancer cells. **IUBMB Life**, v. 64, p. 775-82, 2012.

ZUCOLOTO, S.; DE REZENDE, J.M. Mucosal alterations in human chronic chagasic esophagopathy. **Digestion**, v. 47, p 138–142, 1990.

## ANEXO A



Governo do Estado do Rio Grande do Norte  
Secretaria de Estado da Educação e da Cultura - SEEC  
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE - UERN  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP  
Rua Almirante Miguel da Silva Neto, s/n - Aeroporto  
Home Page: <http://di.uerj.br/uerj/uerj> - e-mail: [cep@uerj.br](mailto:cep@uerj.br) - CEP: 59607-360 - Mossoró - RN

## PARECER CONSUBSTANCIADO CEP/UERN Nº 027/11

Nº PROTOCOLO (CEP)	027/11
Nº CAAE (SISNEP)	0021.0.428.000-11
Título do Projeto	Morbidade da doença de Chagas e avaliação do perfil imunológico de indivíduos sororreativos procedentes de área endêmica do oeste potiguar.

## 1 - RESUMO (Média de 250 palavras) Elaborado pelo(a) relator(a)

A pesquisa tem como objetivo a avaliação clínica de indivíduos sorologicamente reativos para infecção pelo *Trypanosoma cruzi* na mesorregião oeste potiguar, para correlacionar o risco de morte e a resposta imune à cardiopatia chagásica crônica - CCC. Serão avaliados indivíduos sororreativos para *T. cruzi* procedentes da zona rural de Mossoró, Caraúbas, Governador Dix-sept Rosado, Apodi, Severiano Melo e Felipe Guerra, além de pacientes com infecção chagásica pertencentes a mesorregião Oeste Potiguar que procurarem atendimento no Hospital Rafael Fernandes. O período de coleta dos dados se dará após a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP até o 2º semestre de 2012. Estão previstos ressarcimento e/ou indenização aos participantes da pesquisa, caso necessário. Os riscos decorrentes da pesquisa estão descritos bem como seus benefícios. Os sujeitos participarão da pesquisa após leitura e assinatura do TCLE e podem desistir da pesquisa a qualquer momento sem que lhe sejam imputadas nenhuma penalidade. Os dados coletados serão armazenados em computador e mídia por um período mínimo de 5 anos no laboratório de bioquímica da FACS/UERN. O material biológico será armazenado em conformidade com a resolução 347/2005 do CNS. Os gastos oriundos da pesquisa terão como fonte orçamentária recursos do CNPq e FAPERN de acordo com os editais.

## 2 - ENTENDIMENTOS E RECOMENDAÇÕES

O protocolo apresentado atende às recomendações da resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196/96, podendo ser executado a partir da liberação deste parecer. Após o período de realização da pesquisa, o pesquisador deverá preparar um relatório final, conforme modelo contido na home page deste Comitê e em seguida encaminhá-lo a este CEP.

## 3- PARECER

☒ Protocolo de Pesquisa foi aprovado.

Mossoró, 17 de junho de 2011.

Prof. Dra. Dayseanne Araújo Falcão  
Vice-Coordenadora CEP/UERN